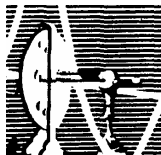


# Andre Luiz Mencialha

## Identificação de genes diferencialmente expressos em células Fanconi do grupo C

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



UFRJ  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Laboratório de Controle da Expressão Gênica  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

# Identificação de genes diferencialmente expressos em células Fanconi do grupo C

Andre Luiz Mencialha

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Januário Bispo Cabral Neto

Agosto de 2006

MENCALHA, Andre Luiz

Identificação de genes diferencialmente expressos em células Fanconi do grupo C/ Andre Luiz Mencalha. - Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2006.

iv. 81f. il: 31 cm

Orientador: Januário Bispo Cabral Neto

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ IBCCF/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2006.

Referências Bibliográficas: f. 69-80.

1. Anemia de Fanconi. 2. *Differential Display*

I. CABRAL NETO, Januário Bispo.

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica).

III. Título.

<b>SUMÁRIO</b>	v
<b>RESUMO</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b>	ix
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	01
1.1 - Guido Fanconi (1892 – 1979)	01
1.2 - Aspectos clínicos	01
1.3 - Freqüência	03
1.4 - Anemia de Fanconi e instabilidade genética	03
1.5 - Anemia de Fanconi: Fenótipos celulares e Diagnósticos	04
1.6 - Genes e proteínas Fanconi	05
1.7 - Via Fanconi/BRCA	12
1.8 - Introdução ao <i>Differential Display</i>	16
<b>2 - OBJETIVO</b>	<b>19</b>
<b>3 - MATERIAIS &amp; MÉTODOS</b>	20
3.1 - Modelo de Estudo (linhagens celulares)	20
3.2 - Tratamento com MMC e análise da sensibilidade celular	21
3.3 - Extração de RNA total	21
3.4 - Purificação dos RNAs	22
3.5 - <i>Differential Display</i>	22
3.5.1 - <u>Transcrição reversa</u>	22
3.5.2 - PCR randômico radioativo	23
3.5.3 - Resolução dos fragmentos de cDNAs	24
3.5.4 - Recuperação dos fragmentos cDNAs	25
3.6 - Clonagem dos Fragmentos de cDNA	26
3.6.1 - Plasmídeo utilizado para clonagem	26
3.6.2 - Clonagem	28
3.7 - Preparação de Bactérias Competentes	28
3.8 - Transformação de Bactéria Competente	29
3.9 - Extração de Plasmídeo em Pequena Escala (Miniprep)	29
3.10 - <i>Northern Blot</i>	30

3.11 - Seqüenciamento Automático de Nucleotídeos	32
3.12 - Identificação dos resultados do seqüenciamento	32
3.14 - PCR em tempo real	34
3.14.1 - Transcrição reversa	34
3.14.2 - Avaliação dos amplicons e PCR	35
<b>4 - RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1 - Sensibilidade das células HSC536 a MMC	37
4.2 - Análise do <i>Differential Display</i>	38
4.3 - Seqüenciamento: Identificação dos fcDNAs	48
4.4 - <i>Northern Blot</i> : expressão diferencial de <i>FcDNA21</i> e <i>C12orf11</i>	50
4.5 - Análise da expressão diferencial dos genes <i>COX5B</i> , <i>STATIP1</i> , <i>TRIM56</i> , <i>FBXO18</i> e <i>FcRLM1</i>	51
<b>5 - DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
5.1 - Anemia de Fanconi	55
5.2 - <i>Differential Display</i>	56
5.3 - Genes encontrados <i>versus</i> Anemia de Fanconi	58
5.4 - PCR em Tempo Real	64
5.5 - Via Fanconi e STATIP1	65
<b>6 - CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
<b>7 - PERSPECTIVA</b>	<b>67</b>
<b>8 - BIBLIOGRAFIA</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO</b>	<b>80</b>

## Resumo

**A**nemia de Fanconi (FA) é uma doença hereditária rara, caracterizada pela falência da medula óssea, mal formação congênita e elevada incidência de câncer, principalmente leucemia mielóide aguda, e hipersensibilidade a agente indutores de ligação cruzada no DNA. O desenvolvimento da FA é resultado de mutação em um dos seus 12 genes (*FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L e M*). Oito produtos desses genes formam o complexo nuclear Fanconi que é necessário para monoubiquitinação de FANCD2, tal modificação é essencial para que esta proteína forme *foci* nuclear, com as proteínas BRCA1, ATM, NBS1 e ATR. Entretanto, a via Fanconi também participa de outros processos celulares, tais como controle do ciclo celular, apoptose, proliferação celular, metabolismo de oxigênio, inflamação, entre outros, mesmo assim ainda é pouco conhecido a importância dos genes Fanconi para estas vias. Por isso, esse trabalho visou avaliar a diferença de expressão gênica através da metodologia de mRNA *Differential Display* (DD). Comparando os padrões de expressão gênica das linhagens HSC536+*fancc* e HSC536 após 4 h depois da incubação com MMC, 32 cDNAs estavam diferenciais entre elas. Onze cDNAs foram identificados através de homologia aos dados disponíveis do genoma humano. Dentre eles foram identificados, *TRIM56, GNG11, PLCB4, FBXO18, MYH9, FCRLM1, COXVb e STATIP1*. Estes genes participam de diferentes processos celulares, como por exemplo sinalização, reparo de DNA, resposta imune/inflamação e estress oxidativo. Para confirmar as diferenças de expressão foi aplicada a metodologia de PCR em tempo Real. Dentre os genes confirmados por PCR em tempo real, *STATIP1*, inibido nas células HSC536, pode ser um indicativo de uma provável interação entre as vias Fanconi e Jak/STAT.

## Abstract

Fanconi anaemia (FA), a rare inherited disorder, characterized by bone marrow failure, congenital malformations, increased risk of cancers, mainly acute myeloid leukaemia, and hypersensitivity to DNA cross-linking agents. FA results from mutations in one of the twelve *FANC* (*FANCA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *I*, *J*, *L* and *M*) genes. Eight of the FANC proteins form a nuclear complex that is required for the mono-ubiquitination of FANCD2 protein a modification essential for its re-localization to nuclear foci, together BRCA1, ATM, NBS1 and ATR proteins. However, FA genes are presents in others cellular process, such as cell cycle checkpoint, apoptosis, cellular proliferation, oxygen metabolism, inflammation, and others, but a little is known how important is these genes to these ways. In order to investigate differential expressed genes we applied Differential Display mRNA assay (DD). Thirty-two cDNAs were found differential between HSC536+*fancc* and HSC536 after 4 hours of end MMC incubation. Eleven of these cDNAs were identify by homology in human data bank. Among them were identify *TRIM56*, *GNG11*, *PLCB4*, *FBXO18*, *MYH9*, *FCRLM1*, *COXVb* and *STATIP1*. These genes have been implicated in several cellular processes, such as intracellular signalling, DNA repair, immune response/inflammation and oxidative stress. In order to confirm the differential expression was applied the Real Time PCR methodology. Among genes confirmed by real time PCR, *STATIP1*, inhibited on HSC536 cells, could be an indicative of probably interaction between Fanconi and Jak/STAT pathways.



## **Lista de abreviações**

µM – micrograma  
AF – Anemia de Fanconi  
BMF – *Bone Marrow Failure*  
cDNA – DNA complementar  
DD – *Differential Display*  
DEB – Diepoxibutano  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
DUB – Deubquitinase  
EBV – Vírus Epstein-Barr  
esDNA – DNA de esperma de salmão  
fcDNA – fragmento de cDNA  
HNSCC – *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*  
ICL – *Interstrand cross-link of DNA*  
IFAR – *International Fanconi Anemia Registry*  
IR – Radiação Ionizante  
LMA – Leucemia Mielóide Aguda  
LMC – Leucemia Mielóide Crônica  
min – minuto  
mL – mililitro  
MMC – Mitomicina C  
mRNA – RNA mensageiro  
NAS – *National American Surveillance*  
NER – Reparo por Excisão de Nucleotídeos  
ng – nanograma  
NHEJ – *non-homologous end joining*  
nm – nanometro  
pg – picogramas  
RH – Recombinação Homóloga  
RNA – Ácido ribonucléico  
RPM – Rotações Por Minuto  
RT – transcrição reversa  
SFB – Soro Fetal Bovino  
SMD – Síndrome Mielodisplásica  
TLS – Síntese Translesão

## **1 - Introdução**

### **1.1 - Guido Fanconi (1892 – 1979)**

Em 1927, o pediatra suíço Guido Fanconi publicou um artigo intitulado “*Familiare infantile perniosaartige Anaemie*”, resultado da observação de uma família, onde três irmãos portadores de anomalias congênitas desenvolveram durante a infância anemia aplástica progressiva (Stevens e Meyer, 2002).

Em breve, veio o reconhecimento de sua observação, e em homenagem a ele esta doença ficou conhecida como Anemia de Fanconi (AF), que se caracteriza pela pancitopenia e mal-formações congênitas. Além desse trabalho, Fanconi descreveu mais 10 tipos de síndromes (Stevens e Meyer, 2002).

### **1.2 - Aspectos Clínicos**

As alterações no sistema hematológico são as características clínicas mais importantes encontradas em pacientes Fanconi e estas são responsáveis pela maior causa de mortalidade destes indivíduos. As alterações hematológicas somente tornam-se evidentes pouco tempo após o nascimento, onde a primeira anormalidade encontrada é a macrocitose, seguido de trombocitopenia até a pancitopenia, que ocorre em média aos 7 anos de idade (Federman, *et al.* 2005).

Associado com desenvolvimento de anomalias hematológicas, os portadores de anemia de Fanconi frequentemente apresentam más formações congênitas. Dentre essas anormalidades, destacam-se a baixa estatura e alteração na pigmentação da pele, do tipo *café-au-lait*, como principais características fenotípicas, 51% e 55%, respectivamente (Taniguchi e D’Andrea,

2006). Segundo Chenausk, em 2006, a baixa estatura está relacionada com a deficiência no crescimento pós-natal, pois recém-nascidos acometidos por essa doença apresentam crescimento intra-uterino normal. Além disso, indivíduos podem também apresentar irregularidades nos membros superiores (43%), na cabeça (26%), nos olhos (23%), renal (21%), nas orelhas (11%) e entre outras (Taniguchi e D'Andrea, 2006).

### **1.3 – Frequência**

Anemia de Fanconi é considerada rara visto sua incidência de 1-5 casos a cada 1.000.000 nascimentos. No entanto, esses valores tornam-se mais significativos do ponto de vista epidemiológico se considerarmos as mutações em heterozigose nos genes relacionados à AF, passando para 1 caso a cada 300 nascimentos (Joenje e Patel, 2001).

De acordo com a Organização de Registro Internacional de Anemia Fanconi (IFAR) e da Agência de Saúde Norte-Americana (NAS) foram registrados um total de 2054 casos de AF durante os anos de 1927 a 2001 (Kutler, *et al.* 2003). No Brasil, um estudo recente obteve 80 amostras de DNA de pacientes Fanconi sem laços consangüíneos no período entre 2001 a 2003 (Magdalena, *et al.* 2005).

Dentre os 754 pacientes Fanconi acompanhados durante o período entre 1982 a 2001 pela IFAR (*International Fanconi Anemia Registry*), 80% destes sofreram falência da medula óssea (BMF) em média aos 7 anos de idade e 16% desenvolveram síndrome mielodisplásica (SMD) e LMA. Esse estudo também mostrou que não há diferença significativa de incidência de anemia de Fanconi entre homens e mulheres, 51% e 49% respectivamente (Kutler, *et al.* 2003).

#### **1.4 - Anemia de Fanconi e instabilidade genômica**

Anemia de Fanconi, embora rara, tem sido um importante modelo para compreensão dos mecanismos de manutenção da integridade do genoma, visto que pacientes Fanconi possuem elevada incidência de câncer (Auerbach, *et al.* 1991; Kutler, *et al.* 2003). Tanto dados clínicos quanto experimentais, mostram que essas informações podem ajudar a compreender o desenvolvimento de vários tipos de cânceres a partir de células saudáveis.

A importância dos genes Fanconi na supressão de tumores, pode ser demonstrada através de modelos camundongos *knockouts* que desenvolvem precocemente vários tipos de cânceres tumores, tais como, tumores epiteliais e ovarianos, adenocarcinomas, linfomas, sarcomas, entre outros (Houghtaling, *et al.* 2003; Wong, *et al.* 2003; Carreau, *et al.* 2004; Freie, *et al.* 2003).

O aparecimento de alguns tipos de cânceres tem sido diretamente relacionado com a anemia de Fanconi. Destacando que a incidência de tumores sólidos em pacientes Fanconi, principalmente tumores de cabeça e pescoço, chega a ser 500 vezes mais frequentes em relação à população em geral (Kutler, *et al.* 2003). Já para o desenvolvimento de neoplasias hematológicas, sobretudo leucemia mielóide aguda (LMA) e crônica (LMC), a incidência pode chegar a 1500 vezes mais do que a encontrada na população (Auerbach, *et al.* 1991).

Além disso, foi visto que 23% dos indivíduos Fanconi desenvolveram neoplasias, das quais 60% são de origem hematológicas e 40% não-hematológicas (Kutler, *et al.* 2003). Desta última, podemos destacar HNSCC (**Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**), que dentre os fatores de risco, está incluso mutações em genes Fanconi. Por ano são registrados 500.000 casos de

HNSCC, sendo que 63% dos casos são indivíduos portadores de mutações em genes relacionados a AF (van Zeeburg, *et al.* 2005).

### **1.5 - Anemia de Fanconi: Fenótipos celulares e Diagnósticos**

As células provenientes de indivíduos acometidos por anemia de Fanconi possuem hipersensibilidade a agentes que se ligam covalentemente na molécula de DNA, os quais são chamados, em inglês, de *Interstrand Cross-Links* (ICLs). Os dois agentes mais utilizados em trabalhos relacionados a AF são a mitomicina C (MMC) e o diepoxibutano (DEB) (Rosselli, *et al.* 2003).

Além dessa sensibilidade a ICLs, estas células apresentam elevada taxa de quebra e rearranjos cromossômicos em relação as células com fenótipo normal, sobretudo quando tratadas com ICLs. Dentre as aberrações cromossomiais, é freqüente a formação de estruturas tri e quadriradiais no cariótipo de indivíduos Fanconi (Figura 1). Tanto a sensibilidade a ICLs quanto instabilidade cromossômica são utilizadas para o diagnóstico de AF (Cervenka, *et al.* 1981; Auerbach, *et al.* 1993).

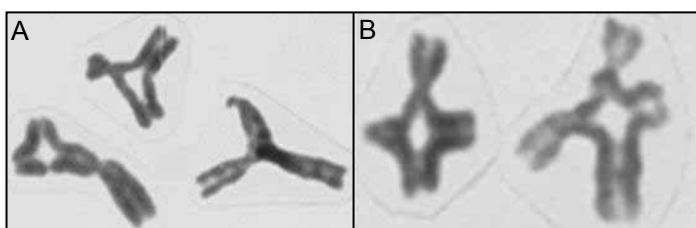


Figura 1: **Anormalidade cromossômica:** estrutura triradiais (A) e quadriradiais (B), características do cariótipo dos pacientes Fanconi. Adaptado de [www.infobiogen.fr](http://www.infobiogen.fr), 2006.

Seychab e colaboradores, em 1993, observaram que células oriundas dos pacientes Fanconi apresentavam anormalidades em relação a progressão do ciclo celular, quando comparadas com células normais. Estas tendem a acumular entre

as fases G2/M do ciclo celular em resposta as lesões no DNA, geradas por radiação ionizante ou ICLs. Os autores desse trabalho propuseram que esta característica seja também incluída nos diagnósticos para AF.

Os pesquisadores Tonnes e colaboradores, em 2003, sugeriram que a amplificação clonal da região do cromossomo 3 (q26-q29) poderia fazer parte das opções de testes-diagnósticos Fanconi, pois tal característica está diretamente relacionada com desenvolvimento de SMD e LMA, as quais freqüentemente ocorrem em indivíduos Fanconi.

A complementação gênica através de vetores virais, contribuiu para um diagnóstico mais preciso em relação a AF. Além de diagnosticar AF através da reversão da sensibilidade a ICLs e redução das quebras cromossômicas, também possibilita identificar, dentre os 12 genes já caracterizados (Tabela 1), o gene mutado em um determinado paciente (Hananberg, *et al.* 2002; Chandra, *et al.* 2005).

### **1.6 - Genes e proteínas Fanconi**

Anemia de fanconi trata-se de uma síndrome bastante heterogênea sendo representada por 12 genes (*FANC-A, B, C, D1/BRCA2, D2, E, F, G, H, I, J e M*) (Taniguchi e D'Andrea, 2006). Os genes Fanconi apresentam-se bastante conservados desde *Danio renio* a *Homo sapiens*, no entanto, *FANCD2* e *FANCL* foram encontrados conservados também em inseto (Titus, *et al.* 2006). Dentre os grupos de complementação encontrados até a presente data, o grupo A é o mais freqüente, seguidos dos grupos C e G. (Tabela 1).

Subtipo	Gene	%	Locí	Monoub. FANCD2
A	<i>FANCA</i>	57	16q24.3	+
B	<i>FANCB</i>	0,3	Xp22.31	+
C	<i>FANCC</i>	15	9q22.3	+
D1	<i>FANCD2</i>	4	13q12-13	-
D2	<i>FANCD1/BRCA2</i>	3	3p25.3	+
E	<i>FANCE</i>	1	6p21-22	+
F	<i>FANCF</i>	2	11p15	+
G	<i>FANCG/XRCC9</i>	9	9p13	+
I	ND	ND	ND	+
J	<i>FANCJ/BACH1</i>	1,6	17q22-q24	-
L	<i>FANCL/PHF9</i>	0,1	2q16.1	+
M	<i>FANCM/Hef</i>	ND	14q21.3	+

Tabela 1: **Genes Fanconi, Frequência, Localização e necessidade para monoubiquitinação da proteína FANCD2:** As mutações mais frequentes são encontradas nos genes *FANCA* seguidos do *FANCC* e *FANCG*. Dentre todos os genes, somente *FANCB* está no cromossomo X. Mutações nos genes *FANCD1* e *FANCJ* não interferem (-) na monoubiquitinação (monoub.) de *FANCD2*. Adaptado de Taniguchi e D'Andrea, 2006. ND: não identificado.

- *FANCA*

*FANCA* é transportada do núcleo para o citoplasma através da associação com a proteína CRM1/*Exportin*, quando CRM1 é “silenciada”, através de RNA de interferência, *FANCA* é encontrada preferencialmente no núcleo da célula. Essa proteína media o transporte exclusivo de *FANCA*, pois *FANCG* e *FANCC*, que se apresentam também distribuídos pela célula, a translocação núcleo/citoplasma/núcleo não é mediado por CRM1 (Ferrer, *et al.* 2005). Mas em resposta ao tratamento com MMC, *FANCA* é quase exclusivamente nuclear, assim como *FANCG* e *FANCC* (Thomashevski, *et al.* 2004).

- *FANCB*

A proteína *FANCB* participa da formação do complexo nuclear Fanconi e é essencial para ativação da via Fanconi (Fei, *et al.* 2005). O gene *FANCB* é o único gene Fanconi localizado no cromossomo X, Xp22.31 (Meetei, *et al.* 2004).

Consequentemente todos os pacientes identificados como grupo de complementação B até agora são homens (Fei, *et al.* 2005).

- FANCC

A proteína FANCC é uma das proteínas Fanconi que faz parte do complexo nuclear Fanconi, está localizada tanto no núcleo quanto no citoplasma da célula (Yamashita, *et al.* 1994). FANCC também mostrou ser essencial para realização do ponto de checagem do ciclo celular em G2/M (Freie, *et al.* 2004). Essa proteína é uma das poucas proteínas Fanconi que ainda não apresentam domínios protéicos conhecidos, mas é essencial para o perfeito funcionamento da via Fanconi (Figura 2).

- FANCD1/BRCA2

Recentemente foi demonstrado que FANCD1 era BRCA2 (Howlett, *et al.* 2002). FANCD1/BRCA2 participa do reparo por recombinação homóloga com RAD51 (Davies, *et al.* 2001), além disso, interage com FANCG em resposta ao tratamento com MMC (Hussain, *et al.* 2003). Esta proteína não participa do complexo nuclear Fanconi e nem é requerida para monoubquitinação de FANCD2 (Howlett, *et al.* 2002), mas participa dos processos de reparo de lesões de DNA gerados por ICLs e IR (Taniguchi e D'Andrea, 2006).

- FANCD2

A monoubquitinação de FANCD2, na lisina 561, é um processo chave na ativação da via Fanconi. Esta modificação tanto mostrou ser essencial para reversão dos fenótipos celulares Fanconi quanto para focalização de FANCD2 e associação com a cromatina (Nakanishi, *et al.* 2005).



Em consequência do *splicing* alternativo, a proteína FANCD2 apresenta duas isoformas. Uma integral FANCD2-44, que traduz um motivo ácido composto pela seqüência de aminoácidos EDGE e a isoforma FANCD2-43 que não possui o exon 44 (Garcia-Higuera, *et al.* 2001). As duas isoformas de FANCD2 não se diferenciam em relação à monoubiquitinação, que ocorre em K561 no exon 19, e na formação de *foci* nuclear. Entretanto, somente a isoforma FANCD2-44 mostrou-se capaz de reverter o fenótipo de sensibilidade a MMC (Oca, *et al.* 2005).

FANCD2 encontra-se mais expressa tanto em resposta a danos no DNA, gerados por ICLs ou IR, quanto em células que possuem alta taxa de proliferação como, por exemplo, espermátócitos maduros, células germinativas do baço, dos linfonodos e das amídalas. Também são encontrados níveis elevados de FANCD2 em células hematopoiéticas e do epitélio escamoso, especialmente nas regiões da cabeça e pescoço e da cervix (Holzel, *et al.* 2003).

- FANCE

A proteína FANCE apresenta domínios de sinalização nuclear (NLS) e é exclusivamente nuclear (Léveillé, *et al.* 2006). FANCE faz parte do complexo nuclear Fanconi e é requerida para monoubiquitinação de FANCD2 (Pace, *et al.* 2002).

- FANCF

Possui uma região que apresenta homologia à proteína de procarionte que se liga a moléculas de RNA conhecida como ROM (de Winter, *et al.* 2000). Além disso, tem sido descrita como uma proteína adaptadora essencial para a formação do complexo nuclear Fanconi (Léveillé, *et al.* 2004).

- FANCG

A proteína FANCG foi identificada como sendo XRCC9 em 1998 por de Winter e colaboradores. Esta proteína pode interagir com as proteínas XRCC3 e BRCA2, através dos motivos TPRs (*Tetratricopeptide Repeat*), diante disso sugere-se que FANCG, além de essencial para formação do complexo nuclear Fanconi, também atue no processo de reparo de danos no DNA por recombinação homóloga (RH) independentemente das demais proteínas Fanconi (Hussain, *et al.* 2006).

FANCG pode ser fosforilada em vários sítos durante a mitose (Thomashevski, *et al.* 2004). Enquanto que, em resposta a tratamento com MMC esta fosforilação somente ocorre na serina 7, sendo essencial para reversão dos fenótipos Fanconi (Qiao, *et al.* 2004).

- FANCI/FANCJ

Em 2004, Levitus e colaboradores revelaram a existência de dois novos grupos de complementação, FANCI e FANCJ. Desde então, experimentos em células *FANCI*<sup>-/-</sup> mostraram que esta proteína era importante para monoUb de FANCD2 ao contrário de FANCJ. No entanto, ambas são essenciais para reversão do fenótipo de sensibilidade a MMC.

O gene *FANCJ* localiza-se no cromossomo 17 e foi identificado como sendo *BRIP1* (Levitus, *et al.* 2005). FANCJ/BRIP1 possui domínio RecQ/DEAH-Helicases (figura 2). Esse domínio também é encontrado em proteínas responsáveis pelas síndromes de Bloom, de Werner e de Rothmund-Thompson (Wood, *et al.* 2005). Através dos domínios BCRT, BRCA1 interage com FANCJ (Cantor, *et al.* 2001). A

monoubiquitinação de FANCD2 ocorre independentemente de FANCI (Bridge, *et al.* 2005).

- FANCL

A proteína FANCL possui motivo PHD *finger*, que está relacionado a atividade de E3 ubiquitina ligase, e repetições WD40, as quais são conhecidas por mediar interação entre proteínas (figura 2). Dentre as proteínas que formam o complexo nuclear Fanconi, FANCL é a responsável pela monoubiquitinação de FANCD2 (Meetei, *et al.* 2003).

- FANCM

Foi identificada como ortólogo a Hef (*Helicase-associated endonuclease for fork-structure DNA*) de arqueobactéria (Meetei, *et al.* 2005). FANCM/Hef possui domínios DEAH-box Helicase e homologia as endonucleases XPF e MUS81 (figura 2). Células mutantes para FANCM/Hef são capazes de realizar reparo de lesões no DNA através de recombinação homóloga, sendo que esse tipo de reparo não ocorre diante de mutações nos demais genes Fanconi. FANCM além de fazer parte do complexo nuclear Fanconi também é essencial para monoubiquitinação de FANCD2, que ocorre em resposta ao tratamento com ICLs (Mosedale, *et al.* 2005).

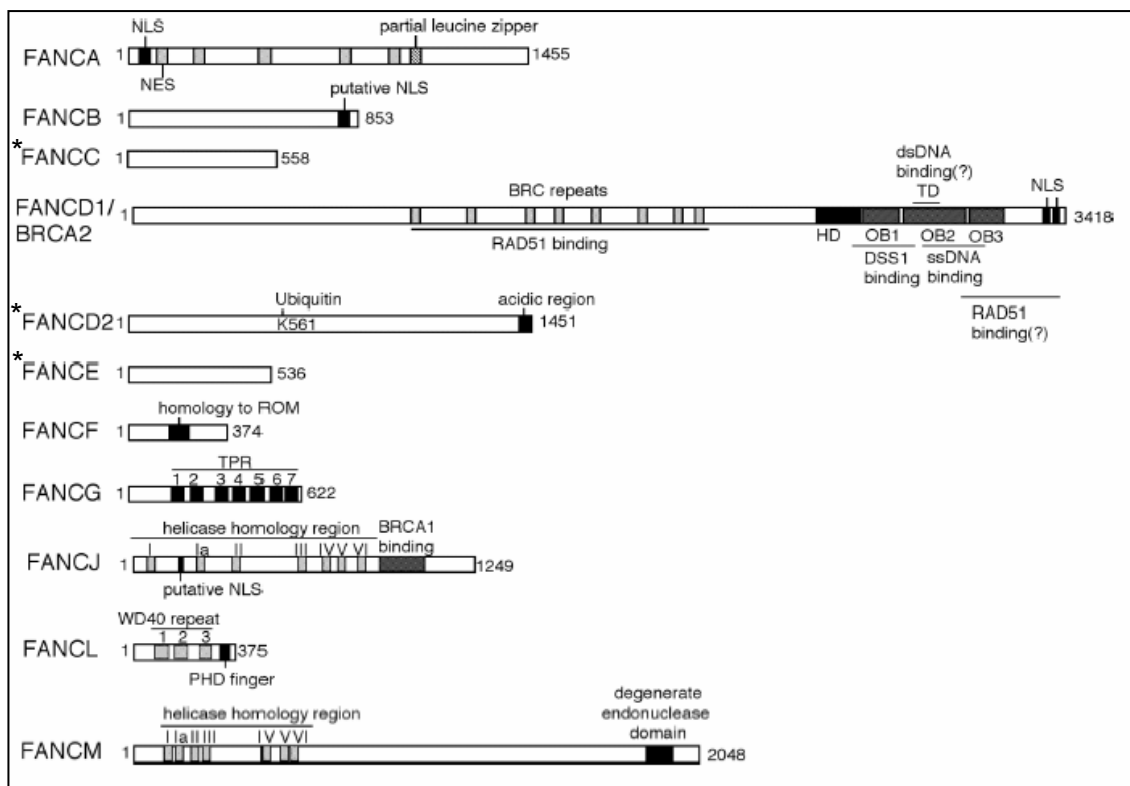


Figura 2: **Domínios das proteínas Fanconi:** Algumas proteínas ainda não possuem seus domínios descritos (\*), mas são essenciais para eficiência de reparo do DNA. dsDNA: dupla fita de DNA; HD: Domínio *Helical*; NES: seqüência para exportação nuclear; NLS: seqüência para localização nuclear; OB: ligação à oligonucleotídeo/oligosacárido; ssDNA: fita simples de DNA; TD: domínio *Tower*; TPR; *tetratricopeptide repeat*. Adaptado de Taniguchi e D'Andrea, 2006.

Proteína Fanconi	KDa	Função
FANCA	163	FA complexo
FANCB	95	FA complexo
FANCC	63	FA complexo
FANCD1/BRCA2	380	Recrutamento de RAD51
FANCD2	155,162	ND
FANCE	60	FA complexo
FANCF	42	FA complexo
FANCG/XRCC9	68	FA complexo
FANCI	ND	ND
FANCI/BACH1	130	5'→3' DNA helicase/ATPase
FANCL/PHF9	43	FA complexo, Ubiquitina ligase
FANCM/Hef	250	FA complexo, ATPase/translocase

Tabela 2: **Proteínas Fanconi e suas principais funções:** As proteínas Fanconi possuem domínios que as conferem tais funções, além de participarem na formação do complexo possuem outras atividades importantes para o reparo de DNA e ativação da via. Adaptado de Taniguchi e D'Andrea, 2006. *KDa*: Kilo Daltons; *ND*: função ainda não definida.

## **1.7 - Via Fanconi/BRCA**

A via Fanconi está basicamente envolvida no processo de reparo de ligações cruzadas no DNA, geradas por ICLs. Esses agentes interagem com o DNA podendo formar monoadutos (ligações em somente uma fita do DNA), biadutos (ligações entre as fitas de DNA) e até mesmo ligando DNA/proteína. Os ICLs são também utilizados no tratamento de certos tipos de câncer, visto seu potencial de afetar mais as células que estão em proliferação (McHugh, *et al.* 2005). Os monoadutos normalmente são reparados por Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER) ou por Síntese Translesão do DNA (TLS). Já os biadutos são reparados através de recombinação, homóloga (HR) ou não homóloga (NHEJ) (McHugh, *et al.* 2001).

Além disso, esta via pode ser também relacionada ao reparo de lesões de quebra dupla de DNA gerados através de radiação ionizante (IR). A ativação desta via tem como característica principal a monoubiquitinação de FANCD2 (Garcia-Higuera, *et al.* 2001). Entretanto, dependendo do estímulo, a ativação pode envolver fosforilação de FANCD2 pelas proteínas cinases, ATM e ATR, que coordenam a transdução de sinal intracelular em resposta a danos na molécula de DNA (Tanigushi, *et al.* 2002; Andreassen, *et al.* 2004). Estas cinases são capazes de coordenar, através de fosforilação, o ciclo celular com reparo de DNA (Osborn, *et al.* 2002).

Em resposta a IR, ATM é a responsável por fosforilar FANCD2, não interferindo na monoubiquitinação e formação de *foci* nuclear de FANCD2 (Taniguchi, *et al.* 2002). Ao passo que em resposta a lesões na molécula de DNA gerados por ICLs, FANCD2 é fosforilada pela ATR (Andreassen, *et al.* 2004).

A ativação da proteína NBS1 e a conseqüente formação do complexo MRN (**Mre11/Rad50/Nbs1**) ocorrem antes da ativação de ATM (Horejsi, *et al.* 2004; Lee, *et al.* 2004). NBS1 é essencial para reparo de ICLs e para ativação da via Fanconi, tanto que, em células Nbs1 ocorre uma diminuição de FANCD2<sup>Ub</sup> (Stiff, *et al.* 2005).

A proteína cinase ATR está envolvida na síndrome síndrome de Seckel, que se assemelha à anemia de Fanconi, *Nijmegen Breakage* e outras síndromes que envolvem respostas a danos no DNA (O'Driscoll, *et al.* 2003). ATR é recrutada pelo complexo RPA (**R**epl**ic**ation **P**rotein **A**), formado em regiões de fita simples de DNA recém sintetizada. Tal evento ocorre em conseqüência da remoção de ICLs, que bloqueia a forquilha de replicação. ATR tem CHK1 (**C**heck-point **K**inase **1**) como principal alvo para o controle de ciclo celular (Bratek, *et al.* 2004). Ao contrário de ATM, a proteína ATR é essencial para ativação da via Fanconi, ou seja, para monoubiquitinação e formação de *foci* nuclear de FANCD2, em resposta a tratamentos com agentes indutores de ICLs (Andreassen, *et al.* 2004).

O processo de ubiquitinação vem sendo descrito, não somente em degradação de proteínas via proteassomo, mais em outros importantes processos celulares, como controle da transcrição gênica, endocitose, reparo de DNA, transdução de sinal, entre outros (Wilkinson, *et al.* 2005). No caso da via Fanconi, a monoubiquitinação de FANCD2, é realizada pela proteína FANCL (Meetei, *et al.* 2003). Enquanto que USP1, uma deubiquitinase (DUB), mostrou ser a mediadora da remoção da ubiquitina de FANCD2 (Nijman, *et al.* 2005). Experimentos de silenciamento, por RNAi, de USP1 não só resultaram em aumento dos níveis de FANCD2<sup>Ub</sup> mas também mostraram um efeito protetor contra as quebras

cromossômica geradas em consequência do tratamento com MMC. Além disso, USP1 pode ser co-imunoprecipitada com FANCD2<sup>Ub</sup> (Nijman, *et al.* 2005). A USP1 também está envolvida na de-ubiquitinação de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) que, uma vez monoubiquitinada, estimula o reparo de DNA por TLS (Niedzwiedz, *et al.* 2004).

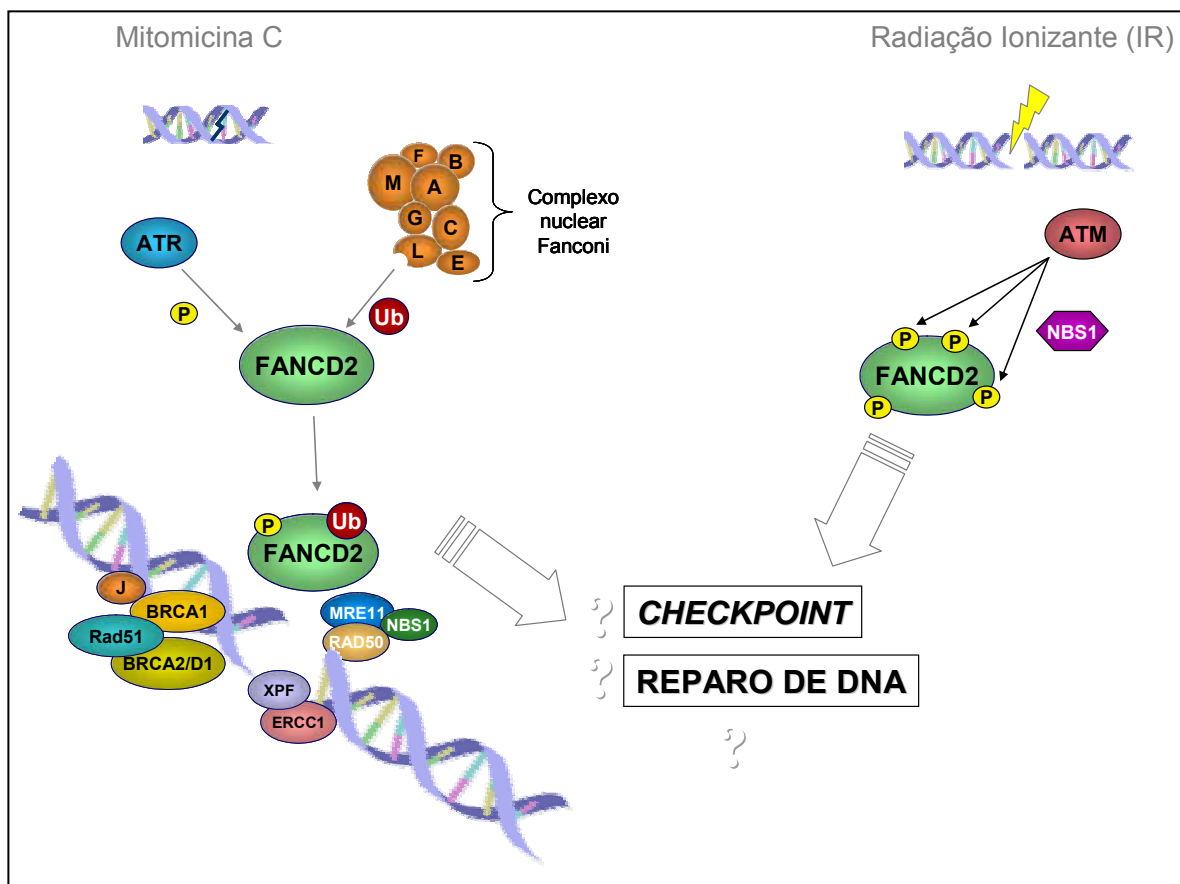


Figura 3: **Esquema de ativação da via Fanconi:** Em resposta a lesões na molécula de DNA, oito proteínas Fanconi formam o complexo nuclear, onde FANCL catalisa a monoubiquitinação da proteína FANCD2. Além disso, FANCD2 também sofre fosforilação por ATM, dependentemente de NBS1, caso as lesões sejam causadas por radiação ionizante enquanto que, se as lesões forem geradas por MMC, FANCD2 é fosforilada por ATR. A monoubiquitinação de FANCD2 é importante para formação de *foci* nuclear juntamente com outras proteínas Fanconi e não Fanconi. Indícios sugerem que esta focalização ocorre em regiões onde o DNA foi danificado. Embora a via Fanconi esteja relacionada basicamente com reparo de DNA, esta também é importante para *checkpoint* e apoptose. Contudo, as proteínas Fanconi são importantes para o reparo, mas encontram-se envolvidos em outros processos celulares, os quais muitos deles ainda são desconhecidos como de fato atuam essas proteínas. Adaptado de Taniuchi e D'Andrea, 2006.

O complexo Fanconi se forma no núcleo da célula através da interação das proteínas FANCA, FANCB, FANCC FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM em resposta ao estresse oxidativo, ao bloqueio da replicação gerados por ICLs e as quebras duplas no DNA gerados por IR. Esse complexo é responsável pela monoubiquitinação da proteína FANCD2 para que esta se acumule em regiões do DNA onde, provavelmente, encontram as lesões. Entretanto, estes eventos são essenciais para o reparo dos danos de DNA, mas ainda é pouco desconhecido como estes reparos são realizados (Tanigushi e D'Andrea, 2006).

As proteínas Fanconi podem associar-se para formar, além do tradicional complexo nuclear Fanconi, complexos com menor número de proteínas Fanconi encontrados em situações específicas (Tabela 3). Além disso, também é possível observar interação de outras proteínas com proteínas Fanconi, como por exemplo, o complexo formado por FANCA, FANCC, FANCG, cdc2 e GRP94 (Kupfer, *et al.* 1997) e a formação do complexo BRAFT, formado pelo complexo nuclear Fanconi e as proteínas BLM, RPA e TopIII $\alpha$  (Taniguchi e D'Andrea, 2006). Após tratamento com MMC esses complexos são exclusivamente nucleares. (Thomashevski, *et al.* 2004).

Compartimento ou condição celular	Proteínas FANC	Tamanho	Resposta a MMC
Citoplasma	A, C, F e G	600 KDa	<
Núcleo	A, C, E, F, G, L e M	2 MDa	>
Cromatina	A*,C, E, F e G	1 MDa	>
Mitose	A, C, F e G*	750 KDa	-

Tabela 3: **Complexos Fanconi**: formados em diferentes compartimentos celulares e durante a mitose, variando na composição das proteínas e em tamanho, podendo em resposta ao tratamento com MMC, aumentar (>), diminuir (<) ou sofrer nenhuma alteração (-) em sua concentração. Adaptada de Thomashevski, 2004. (\*) Forma fosforilada da proteína.



As bases moleculares da anemia de Fanconi são essencialmente relacionadas aos processos de reparo de lesões de DNA e para o controle do ciclo celular. No entanto, algumas proteínas Fanconi também participam de processos celulares não relacionados diretamente com reparo de DNA. Como por exemplo, em etapas do processo de metabolismo de oxigênio, onde já foi mostrada a interação da proteína FANCC com Glutathione S-transferase (Cumming, *et al.* 2001) e com citocromo P450 (Kruyt, *et al.* 1998) e interação de FANCG com P450/2E1 (Futaki, *et al.* 2002).

FANCC também é capaz de modular a expressão de genes que estão envolvidos a processos de inflamação, como os genes *Nuclear Factor 1*, *HSP70* e *COX2* (Reuter, *et al.* 2003; Zanier, *et al.* 2004). Pang e colaboradores, em 2000, apresentaram evidências que FANCC liga-se a STAT1, uma proteína transdutora de sinal e ativadora transcricional. Além disso, a proteína FANCA interage com BRG1, uma proteína do complexo SWI/SNF importante na remodelação da estrutura da cromatina (Otsuki, *et al.* 2001).

### **1.8 - Introdução ao *Differential Display***

A metodologia foi elaborada por Liang e Pardee em 1992 e, desde então, tem sido amplamente utilizada para identificação de genes diferencialmente expressos. Esta técnica possibilita avaliar diferenças na expressão gênica entre inúmeras situações e em diferentes organismos.

O *Differential Display* (DD) é uma ferramenta simples, pois se baseia em PCR e eletroforese em gel de seqüenciamento, sensível, já que são necessárias

pequenas quantidades de RNA total. Além disso, essa metodologia permite a identificação de novos genes ao contrário do *microarray*, onde são analisados somente os genes contidos no *chip*. Entretanto, o DD é uma metodologia capaz de gerar falsos-positivos, mesmo assim desde sua descoberta esta técnica vem sendo cada vez mais utilizada por pesquisadores. Além disso, o DD tem sido fundamental para uma primeira abordagem científica de trabalhos que têm como objetivo investigar alterações em nível de expressão gênica.

A técnica tem como princípio estimar o aumento ou diminuição da quantidade de mRNA através do maior ou menor acúmulo deste até o momento de sua extração. Para tal, esses mRNAs são transcritos reversamente com auxílio de oligos-dTs, que se diferenciavam entre si através da inserção de um nucleotídeo A, C ou G, após a seqüência de timinas, na extremidade 3'OH. Esta adaptação resulta na separação de três populações de mRNA pertinentes a estas modificações, após a transcrição reversa.

Em seguida, esses cDNAs são amplificados por PCR de baixa estrigência, onde na reação contem um nucleotídeo livre radioativo. O produto desta reação resolvido em gel de poliacrilamida desnaturante. Após o término eletroforese, o gel é fixado em papel de filtro e exposto a um filme de autoradiograma, que revelado, possibilita a identificação dos fragmentos de cDNAs diferenciais, ou seja, os cDNAs que se apresentam diferentes entre as situações proposta no trabalho.

A metodologia de DD tem sido utilizada extensivamente em diversos modelos de doenças, incluindo anemia de Fanconi. Em 1997, os pesquisadores Li e Youssoufian, identificaram que o gene *MxA*, que codifica uma GTPase, está superexpresso nos grupos de complementação A, B, C e D. Além disso, Planitzer

e colaboradores publicou dois trabalhos em 1998 utilizando a linhagem de fibroblatos Fanconi, H94-38, e comparou a expressão gênica através da metodologia do DD. No primeiro trabalho foi identificado a superexpressão de um gene homólogo a *Fosfatase-fosfoserina-L-3* e no segundo, eles detectaram pequenas deleções na região 3'-UTR (*Untranslated Region*) do gene Tropomiosina-alfa, em ambos os trabalhos estas duas alterações apresentava-se em fibroblastos Fanconi.

Os trabalhos até agora realizados com anemia de Fanconi ainda são insuficientes para a análise das variações da expressão gênica, pois: primeiro, cada conjunto de combinações de iniciadores ancoragem-randômicos somente é capaz de avaliar uma parte dos mRNAs transcritos, e segundo que, existe variações experimentais quando utilizadas células ou linhagens de diferentes origens. Neste presente trabalho, propomos utilizar combinações de iniciadores que ainda não foram utilizados e a linhagem de linfoblastos humanos, HSC536, oriunda de paciente do grupo de complementação C.

Além disso, a diversidade de processos celulares de que os genes Fanconi participam não se restringe a somente as descobertas realizadas até a presente data. Contudo, a via Fanconi é ativada através de uma intrincada rede de transdução de sinal pouco conhecida e o estudo da modulação da expressão gênica associada a esta via pode ser útil para a compreensão das bases moleculares dessa doença.

## **2 - Objetivo Geral**

- Identificação de novos genes envolvidos na anemia de Fanconi

### **2.1 - Objetivos específicos**

- Comparar as diferenças dos níveis de mRNAs decorrentes da inativação do gene *fancc*.
- Comparar as diferenças dos níveis de mRNAs diante do tratamento com agente genotóxico MMC em células proficientes ou deficientes na via Fanconi/BRCA.
- Associar os resultados encontrados com a clínica e fenótipos celulares relacionados a mutações em genes Fanconi.

### **3 - Materiais & Métodos**

#### **3.1 - Modelo de Estudo (linhagens celulares)**

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram obtidas no laboratório de Génétique moleculaire, UPR 2169 CNRS- Villjuif, França. Trata-se de linhagens de linfoblastos humanos provenientes de pacientes com anemia de Fanconi do grupo C (93HH.1 S22-NEO - Fanconi do grupo C - FANCC) imortalizadas por EBV. Estas células foram corrigidas com a expressão ectópica do gene *FANCC* selvagem em vetor de expressão. As células *FANCC*<sup>-/-</sup> não corrigidas também foram transfectadas com o mesmo vetor sem o gene *FANCC*, contendo, portanto, o mesmo *background* genético com exceção do gene *FANCC*, originando, desta forma, uma linhagem isogênica (*HSC536+fancc* - complementada com gene *FANCC*). Essas células foram mantidas na densidade de 300.000 células/mL em meio RPMI com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) e suplementadas com 200ug/mL de G418 (Geneticin – Invitrogen).

#### **3.2 - Tratamento com MMC e análise da sensibilidade celular**

Para estes ensaios as culturas de células foram utilizadas na densidade de 300.000 células/mL em RPMI. Em seguida, 100ng/mL de mitomicina C (MMC; Sigma) eram adicionados ao meio de cultura e as células mantidas durante 1h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final deste período, as células eram centrifugadas a 1300 rpm por 5 minutos e ressuspensas em igual volume de meio fresco (pré-aquecido a 37°C), sendo mantidas na condição padrão de cultivo especificado em

cada experimento. Em todos os casos, uma alíquota das culturas era reservada para avaliação da sensibilidade a MMC. Estas alíquotas eram mantidas em cultura até 48h após o tratamento com MMC, sendo que a sobrevivência celular era estimada através da técnica de exclusão do corante azul de Tripán 0,1% (Sigma). O azul de Tripán penetra apenas as células mortas, corando o citoplasma das mesmas de azul. A quantidade de células potencialmente viáveis e células inviáveis eram estimadas com auxílio do hemocitômetro. Para a curva de sobrevivência celular ao tratamento com MMC foram utilizados 50, 100 e 300 ng do agente genotóxico por mL de meio de cultura, sendo a sobrevivência celular analisada 48h após o tratamento.

### **3.3 - Extração de RNA total**

As células HSC536+*fancc* e HSC536 controles e tratadas ( $10^6$  células/ponto) foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, ressuspendidas em PBS 1X (0,8% NaCl [p/v], 0,02% KCl [p/v], 0,15% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [p/v], 0,024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [p/v], pH 7,4) e novamente centrifugadas nas mesmas condições da primeira centrifugação. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em 1mL de reagente Trizol (Invitrogen) para extração de RNA total, baseado em Chomczynski e Sacchi, 1987. Após a adição do Trizol as amostras foram homogeneizadas e, em seguida, incubadas por 5 min a 27°C. Os homogeneizados foram transferidos para tubos estéreis de 1,5 mL e centrifugados a 12.000 x g por 10 min a 4°C.

Após transferir os sobrenadantes para novos tubos, a estes foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e incubados por 5 min a 27°C. Em seguida, as

amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C. A fase aquosa de cada extração foi transferida para tubos novos, aos quais foram adicionados 0,5 mL de Isopropanol e, em seguida, incubados por 10 min à 27°C. As amostras eram, então, centrifugadas durante 10 min em 12.000 x g a 4°C e os RNAs obtidos lavados com etanol gelado 75% diluído em água tratada com dietil-pirocarbonato 0,1% (DEPC). Depois da lavagem, os precipitados foram novamente centrifugados a 12.000 x g por 10 min a 4°C sendo finalmente ressuspendidos em 50µL de água tratada com DEPC e estocados a -70°C até o uso.

### **3.4 - Purificação dos RNAs**

Para eliminar as possíveis contaminações com DNA, os RNAs obtidos foram submetidos a reação de digestão com DNAase seguindo protocolo da RQ1 RNase-free DNase (Promega). Em seguida, o RNA proveniente desta reação foi purificado com kit RNeasy (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

### **3.5 - Differential Display**

As alterações nos níveis de mRNA foram analisadas com base na metodologia criada por Liang e Pardee em 1992.

#### **3.5.1 - Transcrição reversa**

Os RNAs obtidos foram subdivididos em três populações diferentes quando transcritos reversamente, utilizando iniciadores de ancoragem que variam em um nucleotídeo na extremidade 3'-OH devidamente especificados na tabela 4.

Cada reação foi constituída de incubação de 6,4µL de água DEPC, 1,6µL de mistura de dNTPs (250µM de cada, Invitrogen), 2µL de RNA total (0.25µg/µL) e 2µL de iniciador ancoragem (2µM) durante 65°C por 5 min, seguido de incubação no gelo por pelo menos 5 min. Posteriormente, adicionou-se 4µL de 5X RT *Buffer*, 2µL DTT (0,1M), 1µL de Inibidor de RNase (40U/µL, Invitrogen) e 1µL de MMLV RT (200U/µL, Invitrogen), incubando por 37°C durante 50 min. A reação foi inativada mantendo-a durante 15 min a 70°C. Para uma amostra de RNA foram realizadas três reações, uma para cada iniciador de ancoragem.

### **3.5.2 - PCR randômico radioativo**

Após a reação de transcrição reversa, cada grupo de cDNAs (A, C e G), foi amplificado por PCR, usando 8 diferentes iniciadores randômicos, especificados na tabela 4, perfazendo um total de 24 combinações diferentes. Adotando que cada combinação era constituída de um oligo de ancoragem com um randômico.

A reação do PCR constituiu de 9,5µL de água MiliQ, 2µL 10X PCR *buffer*, 0,6µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1,6µL dNTP (25µM de cada, Invitrogen), 2µL do iniciador randômico (2µM), 2µL do iniciador de ancoragem (2µM), 2µL do produto da transcrição reversa, 0,15µL de α-[<sup>32</sup>P]dCTP (10mCi/mL, Amershan) e 0,2µL de *Taq DNA polymerase* (5U/µL, Invitrogen). Programa do termociclador: 94°C por 1 min seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30s, 39°C por 2min, 72°C por 30s e com extensão final de 5 min a 72°C.



<b>Designação</b>	<b>Iniciadores de Ancoragem (5'→3')</b>
H-T <sub>11</sub> A	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'
H-T <sub>11</sub> C	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'
H-T <sub>11</sub> G	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'
<b>Designação</b>	<b>Iniciadores randômicos (5'→3')</b>
H-AP1	5'-AAGCTTGATTGCC-3'
H-AP2	5'-AAGCTTCGACTGT-3'
H-AP3	5'-AAGCTTTGGTCAG-3'
H-AP4	5'-AAGCTTCTCAACG-3'
H-AP5	5'-AAGCTTAGTAGGC-3'
H-AP6	5'-AAGCTTGCACCAT-3'
H-AP7	5'-AAGCTTAACGAGG-3'
H-AP8	5'-AAGCTTTTACCGC-3'

Tabela 4: **Seqüência dos iniciadores iniciadores**

**utilizados no DD:** Os iniciadores contém sítio para digestão com HindIII (AAGC). Os iniciadores de ancoragem variam no nucleotídeo 3' após a repetição de 11 timinas.

### **3.5.3 - Resolução dos fragmentos de cDNAs**

Os cDNAs amplificados por PCR utilizando as combinações dos iniciadores, de ancoragem com randômicos, foram separados através de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6% (*GDP - uréia 0,41% [p/v], acrilamida 0,05% [p/v], bisacrilamida 0,003% [v/v], tris 0,011% [p/v], 0,004% EDTA 0,5M pH 8 [v/v] e Ácido bórico 0,006% [v/v]*).

Antes de efetuar a migração dos cDNAs obtidos, era realizada uma “pré-corrída”, somente com a solução *Loading Dye* (LD - 95% formamida, 10mM EDTA pH8, 0,009% Xileno cianol, 0,009% Azul de bromofenol), objetivando o aquecimento do gel a aproximadamente 55°C. Após a pré-corrída, 3,5 µL de cada produto da PCR eram misturados a 2 µL de solução LD, incubados a 80° por 3 min e, em seguida, submetidos a resolução no gel. As condições para eletroforese foram estabelecidas com 1500 Volts, 60 Watts e 45 mA, mantendo a potência constante. O fim da migração era determinada quando o corante Xileno cianol se distanciava de aproximadamente 30cm do local da aplicação.

Os géis eram retirados da placa de vidro, com o auxílio de papel de filtro 1,0 mm e protegidos com filme plástico de PVC durante o processo de secagem a vácuo por 1h a 80°C. O sistema gel/papel/PVC devidamente seco era, então, exposto ao filme de autoradiograma (Kodak X-MAT) por 24 horas, sendo cuidadosamente orientado, papel *versus* filme de autoradiograma. Através disso, após a revelação, foi possível analisar os fragmentos de cDNAs quanto ao padrão de expressão diferencial entre as linhagens e tratamentos, localizá-los e recuperá-los.

#### **3.5.4 - Recuperação dos fragmentos cDNAs**

Para estimar os fragmentos diferenciais foram realizadas quantificações em nível de densitometria, a partir da imagem do autoradiograma, utilizando o programa ImageQuant<sup>®</sup> (Molecular Dynamics).

Os fragmentos de cDNA escolhidos foram recuperados do gel fixado no papel, através de hidratação do pedaço de papel de filtro, adicionando a este 300 µL de água MiliQ por 16 horas a 27°C. Em seguida, este material foi fervido por 15 min, centrifugado a 1000xg por 1 min e o sobrenadante transferido para novo tubo. O cDNA recuperado do papel de filtro foi precipitado com auxílio de 5 µL de glicogênio (10 µg/µL, Invitrogen), 30 µL de Acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 800 µL de Etanol 100%, incubando-o a -20°C por 16 h. Após esse período, estes foram centrifugados a 12.000xg por 10 min a 4°C e os precipitados lavados com Etanol 85% gelado, centrifugados novamente 12.000xg por 10 min a 4°C e, por fim, dissolvidos em 10µL de água MiliQ.

Quatro  $\mu\text{L}$  de cada cDNA eluído foram submetidos a re-amplificação por PCR utilizando as mesmas combinações de iniciadores ancoragem-randômicos do *Differential Display*. As reações continham, 15,2 $\mu\text{L}$  de água MiliQ, 4 $\mu\text{L}$  de 10X PCR *buffer*, 1,2 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 3,2 $\mu\text{L}$  de mistura de dNTPs (250 $\mu\text{M}$  de cada, Invitrogen), 4 $\mu\text{L}$  de oligo randômico (2 $\mu\text{M}$ ), 4 $\mu\text{L}$  de oligo de ancoragem (2 $\mu\text{M}$ ) e 0,2 $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen). Estas reações foram incubadas no termociclador programado para incubação inicial 94°C por 1 min, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30s, 39°C por 2 min e 72°C por 30s, após esta ciclagem, uma incubação a 72°C durante 5 min. As reamplificações dos cDNAs foram confirmadas através da resolução dos produtos das PCRs sob eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo (*concentração final de 0,0001%*) em TAE1X (0,5% *tris* [p/v], 0,12% *Ácido acético* [v/v], 0,2% *EDTA* 0,5M pH 8 [v/v]).

### **3.6 - Clonagem dos Fragmentos de cDNA**

#### **3.6.1 - Plasmídeo utilizado para clonagem**

O plasmídeo pGEM-T foi desenvolvido pela empresa de biotecnologia Promega para clonagem direta do produto obtido da reação de PCR. Para isso, os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRV* e, nas extremidades resultantes da digestão, foram adicionadas uma timidina em ambas as “pontas” 3'OH. Estas terminações servem para aumentar a eficiência da ligação entre pGEM e os produtos da PCR, tendo em vista que certas enzimas DNA

polimerases adicionam um nucleotídeo adenina nas extremidades 3'OH dos amplicons.

A região de clonagem está flanqueada pelas seqüências promotoras T7 e SP6 da RNA polimerase e localizada internamente a seqüência codificante do  $\alpha$ -peptídeo da enzima  $\beta$ -Galactosidase. Com isso, a seqüência do inserto pode ser determinada através da reação de Seqüenciamento com ambos os iniciadores complementares às regiões promotoras T7 e SP6. Além disso, a inativação do  $\alpha$ -peptídeo permite que os clones recombinantes, com inserto, sejam identificados diretamente através da coloração da colônia. Quando as colônias apresentam coloração azulada, as bactérias dessa colônia receberam o plasmídeo sem o inserto, enquanto que as colônias brancas, são compostas por bactérias que receberam os plasmídeos contendo inserto de cDNA na região descrita anteriormente.

### **3.6.2 - Clonagem**

Os cDNAs devidamente reamplificados foram clonados em pGEM<sup>®</sup>-T *Vector* (Promega). As clonagens foram realizadas na razão de 3:1 determinada pela fórmula indicada no protocolo do kit. Diante disso, as reações seguiram as instruções cedidas pelo fabricante contendo 1X *Rapid Ligation Buffer*, 50ng de pGEM-T *Vector*, 3U de T4 DNA ligase, ajustando, para cada cDNA, o volume do produto da PCR para 10 $\mu$ L com água MiliQ. As reações foram realizadas a 4°C durante 16 h.

Em seguida, 2 $\mu$ L dos produtos dessas reações foram transformados através do método químico em *Escherichia coli* (DH5ALFA: Cultivada a 37°C.

Genótipo: *supE44 ΔlacU169 [Δ80 lacZΔM15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). Após transformação e recuperação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB (1% *Bacto-triptona*, 0,5% *Bacto-extrato de levedura* e 1% *NaCl*, pH 7), contendo Ampicilina (100 ug/mL), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80 ug/mL) e incubadas por 16h a 37°C, sendo as colônias brancas recuperadas e crescidas em meio LB líquido durante 16h em 37°C sob agitação constante. Posteriormente, os plasmídeos contendo o inserto, foram recuperados das bactérias através da lise alcalina.

### **3.7 - Preparação de Bactérias Competentes**

As preparações das bactérias foram baseadas Sambrook (1987). As bactérias competentes foram conseguidas inoculando numa colônia isolada em 2 mL de meio SOB (2% de *Bacto-triptone* [p/v], 0,5% de *Bacto-extrato* [p/v] de *levedura* e 0,005% de *NaCl* [p/v], *MgCl<sub>2</sub>* 2M 0,5% [v/v]) e mantendo a cultura sob agitação durante 2 horas a 37°C. Após este período, acrescentaram-se mais 50 mL do mesmo meio e realizou-se nova incubação a 37°C por cerca de 2 a 3 horas, até que a medida de absorbância em 600nm tivesse alcançado valores entre 0,5 e 0,6 de DO.

Em seguida foram adicionados 0,5 mL de *MgCl<sub>2</sub>* 1M, mantendo-se as bactérias no gelo por 15 minutos. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C, sendo o precipitado ressuscitado em 15 mL de solução RFI a 4°C (*Acetato de potássio* 30 mM pH 6.9, *MnCl<sub>2</sub>* 50 mM, *KCl* 100 mM, *CaCl<sub>2</sub>* 10mM e *glicerol* 15% [v/v]). Passados 10 minutos no gelo, nova centrifugação foi realizada e as bactérias foram ressuscitadas em 2 mL de

solução RFII a 4°C (*MOPS 10 mM pH 7.0, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, KCl 10 mM e glicerol 15% [v/v]*). Este volume foi, então, dividido em alíquotas de 50-100 µL e armazenadas a -70°C.

### **3.8 - Transformação de Bactéria Competente**

A metodologia foi baseada em Hanahan (1983). As bactérias competentes foram retiradas do congelador a -70°C e mantidas em gelo por 15 minutos. Adicionou-se 2 µL do plasmídeo desejado em uma reação de ligação contendo 50 µL de bactérias competentes. Os tubos Eppendorf permaneceram no gelo durante 30 minutos e, então, foram submetidos a um choque térmico: 2 minutos a 42°C seguido de retorno ao gelo por mais 3 minutos. Em seguida, 300 µL de meio SOC (*2% de Bacto-triptone [p/v], 0,5% de Bacto-extrato [p/v] de levedura e 0,005% de NaCl [p/v], MgCl<sub>2</sub> 2M 0,5% [v/v], glicose 20 mM*) pré-aquecido a 37°C foram adicionados as preparações, seguindo-se uma incubação de 1 hora a 37°C, sob forte agitação. As culturas foram inoculadas em meio LB sólido, na presença do antibiótico adequado, permanecendo cerca de 16 horas a 37°C para a multiplicação das bactérias transformadas.

### **3.9 - Extração de Plasmídeo em Pequena Escala (Miniprep)**

As extrações dos plasmídeos foram baseadas em Sambrook (1987). Uma colônia de bactérias foi isolada e inoculada em 3 mL de meio LB líquido, contendo o antibiótico adequado. Após incubação durante a noite a 37°C, cerca de 1,5 mL da cultura foi transferido para tubo Eppendorf. Centrifugou-se a 13.000xg durante

1 min e o sobrenadante foi descartado, adicionando-se mais 1,5 ml da cultura e centrifugando-se novamente.

O sobrenadante foi retirado e as bactérias foram ressuspensas em 30 µL da solução P1 (50 mM glicose, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8), utilizando-se o agitador de tubos. Em seguida, foram adicionados 300 µL da solução P2 (0,2 N NaOH e 1% SDS)<sup>1</sup>. Os tubos foram agitados por inversão suave e incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Adicionando-se 300 µL de acetato de potássio 3M (pH 5,5) e, novamente, os tubos foram agitados por inversão suave após a adição da solução. As preparações foram centrifugadas a 13.000xg durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo. Foram colocados 400 µL de isopropanol e as preparações foram mantidas em temperatura ambiente durante 5-10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 13.000xg durante 10 minutos. O DNA precipitado foi lavado com álcool etílico gelado 70% e novamente centrifugado durante 3 minutos a 4°C. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em 50µL de tampão TE (10 mM Tris-Cl e 1 mM EDTA, pH 8.0).

### **3.10 - Northern Blot**

Os procedimentos para realização do *Northern* foram fundamentadas em Sambrook (1987), enquanto que a marcação das sondas foi adaptada de Kang, 1998. Após extração dos RNA, estes foram submetidos a eletroforese em gel desnaturante contendo formaldeído, transferidos para membranas de nitrocelulose por capilaridade durante 16h, que foram submetidas a hibridização com sondas de

---

<sup>1</sup> Solução P2 deve ser preparada na hora em que for ser usada.

DNA marcadas com P<sup>32</sup>-dCTP incorporado a estas por amplificação por PCR (ver adiante).

Quinze µg de RNA total foram incubados durante 5 min a 70°C contendo 1X MOPS pH 7 (0,01 M MOPS pH 7, 4 mM Acetato de sódio e 0,5 mM EDTA pH 8), 2,2 M formaldeído e 50% de formamida com posterior incubação no gelo por no mínimo 5 min. Depois desse processamento, foram resolvidos em gel de agarose 1%, 2,2 M de formaldeído, 1X MOPS pH 7 em TAE 1X DEPC.

Após eletroforese, parte do gel foi corado com Brometo de Etídio e a outra transferida por capilaridade em solução 20X SSC (17,5% NaCl [p/v] e 8,8% Citrato de sódio [p/v]) para membrana de nitrocelulose (0,20µm, BioRad) durante 16h. Em seguida, as membranas foram lavadas em 6X SSC e os RNA fixados covalentemente a estas sob exposição a UV durante 5min (λ=254nm).

Para incorporação do dCTP radioativo foram realizadas amplificações por PCR onde cada reação continha 1X PCR *Taq buffer*, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de Mistura de dNTPs (A, G e T), 0,01 mM de dCTP, 50µCi dCTP[P<sup>32</sup>] (Amershan), 1U de *Taq DNA polymerase*, 2µL do plasmídeo/inserto, 0,2µM oligo T7-*promoter*, 0,2 µM oligo SP6-*promoter* em um volume final de 100µL. Esta reação foi incubada inicialmente a 94°C por 5min, seguindo 35 ciclos de 94°C por 30s, 45°C por 30s, 72°C por 45s. Por fim, incubando a 72°C por 5min.

Antes da hibridização com as sondas radioativas estas foram purificadas com auxílio de Sephadex G-50 (Sigma). As membranas foram submetidas à incubação com DNA de esperma de salmão 100 µg/mL (esDNA, Sigma) em solução de hibridização (6X SSC, 5X *Denhardt's* [0,1%Ficoll, 0,1% de polivinilpirrolidone, 0,1% BSA] e SDS 0,5%) durante 4h a uma temperatura de



42°C. Depois do bloqueio, as membranas foram incubadas com  $10^8$  CPM/mL de sonda radioativa durante 16 h a 42°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com 0,1X SSC e 0,5% SDS a 55°C durante 30 min. As imagens foram obtidas através com auxílio dos sistemas Phosphoimage e avaliadas através do ImageQuant<sup>®</sup> (Molecular Dynamics).

### **3.11 - Seqüenciamento Automático de DNA**

As amostras de DNA utilizadas em reações de seqüenciamento de DNA foram provenientes de extrações de DNA plasmidial em pequena escala segundo protocolo descrito anteriormente. O seqüenciamento automático baseia-se na técnica de terminação de síntese de DNA (Sanger, *et al.* 1977), ocorrendo a incorporação de marcadores fluorescentes os quais correspondem, cada um, a uma das quatro bases nitrogenadas. As reações foram feitas utilizando-se o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* e foram analisadas nos seqüenciadores ABI Prism 3700 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) no Laboratório do Dr. Carlos F. Menck (Dep. de Microbiologia, Instituto de Biociências - USP, São Paulo, SP), seguindo instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados para seqüenciamento foram **T7** 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' /**SP6** 5'- AAG ATA TCA CAG TGG ATT TA-3'.

### **3.12 - Identificação dos resultados do seqüenciamento**

Os cromatogramas foram visualizados e analisados através do programa *BioEdit*<sup>®</sup> 7.0.5.1. As seqüências foram identificadas *in silico* através de homologia à

base de dados sobre o genoma humano, utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Location Alignment Search Tool*, [www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/)).

### **3.13 - Real-Time PCR: elaboração dos iniciadores**

Os iniciadores foram desenhados de acordo com instruções contidas no manual do *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix and RT-PCR* (Applied Biosystems), com auxílio da ferramenta disponível *on-line* na página da IDT (*Integrated DNA Technologies* - [www.idt.org](http://www.idt.org)). As seqüências dos mRNAs foram obtidas no banco de dados do genoma humano ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)).

A especificidade dos oligonucleotídeos foram determinadas previamente *in silico* diante de sua homologia à dados de mRNAs humanos através da ferramenta BLAST/HumanGenome ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/humangenome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/humangenome)), realizando buscas de baixa expectativa. Os melhores iniciadores foram determinados quando possuíam homologia (*Hits*) exclusivamente com seus alvos. Na tabela 5 está o resumo dos iniciadores usados.

GENE ALVO		5' – PRIMER – 3'	bp	Tm °C	AMPLICON
N° Acesso					
<b>ACTB</b> NM_001101	F	TGGAACGGTGAAGGTGACA	19	56	82 bp
	R	ATGTGCAATCAAAGTCCTCGGC	22	58	
<b>GAPDH</b> NM_002046	F	CATCTTCCAGGAGCGAGA	18	54	165 bp
	R	TGTTGTCATACTTCTCAT	18	52	
<b>COX5B</b> NM_001862	F	AAGAGGACAATACCAGCGTCGT	22	58	87 bp
	R	CCAGCTTGTAATGGGCTCCA	20	57	
<b>FBXO18</b> NM_178150	F	AAGCTGGACCTGCCATTTCT	20	57	80 bp
	R	TCCCTGACCAGATACATCCAGA	22	57	
<b>FCRLM1</b> NM_032738	F	GATGCAAGGGAAGCTGGCTT	20	58	197 bp
	R	AGAGCTGAGCCATCTCGGTA	20	57	
<b>TRIM56</b> NM_030961	F	GCCAAACTGCTAACCCGCTT	21	58	162 bp
	R	AGAGTTAAGGTCACGCCACCA	20	58	
<b>STATIP1</b> NM_018255	F	CCACTGTCCCTGCATTGGGATT	22	60	118 bp
	R	GCCACCTGCTGATACTCAA	20	55	

Tabela 5: **Iniciadores utilizados para análise da expressão diferencial com PCR em tempo real.** Os iniciadores, senso (F) e antisenso (R) foram elaborados a partir dos mRNAs obtidos através do número de acesso (NM\_) dos genes em questão em [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), (bp) corresponde ao tamanho dos iniciadores em pares de bases.

### **3.14 – PCR em tempo real**

#### **3.14.1 - Transcrição reversa**

Para avaliação da expressão gênica diferencial entre as células HSC536+*fancc* e HSC536 e também sob tratamento com MMC estas foram incubadas com 100 ng de MMC/mL na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL durante 1 h. Os RNAs foram extraídos com reagente TRIzol (Invitrogen) após 4 h da retirada do meio de cultura contendo MMC. Em seguida tratados com DNase (Promega) e purificados com RNeasy (Qiagen).

Após extração e purificação todos os RNAs, controles e tratados, foram quantificados (Biophotometer). Cada reação de RT foi constituída incubando 1µg de RNA, com 1µL de Mistura de dNTPs (10 mM de cada, Invitrogen), 1µL de

OligodT18 (500µg/mL, IDT) em um volume final de 12µL durante 65°C por 5 min, seguido de incubação no gelo por pelo menos 5 min. Posteriormente, adicionou-se 4µL de 5X RT-*buffer*, 2µL DTT (0,1M), 1µL de Inibidor de RNase (40U/µL, Invitrogen) e 1µL de MMLV RT (200U/µL, Invitrogen), incubando por 37°C durante 50 min. A reação foi inativada mantendo-a durante 15 min a 70°C.

Os cDNAs foram diluídos para concentração estimada de 3 ng/µL com base na adição inicial de 1µg em um total 20µL de volume final de reação, divididos em alíquotas e armazenados a -70°C até uso.

### **3.14.2 - Avaliação dos amplicons e PCR**

Antes da análise dos amplicons com *SYBR<sup>®</sup>Green* (Applied Biosystems), os cDNAs foram amplificados por PCR e resolvidos em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. As reações foram constituídas com 1x PCR *buffer* (20 mM *Tris-HCl pH 8.4*, 50 mM *KCl*), 1,5mM de *MgCl<sub>2</sub>*, 2mM de mistura de dNTPs (Invitrogen), 2µM oligo senso (do gene em questão), 2µM oligo antisenso (do gene em questão), 1 Unidade de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 2µL cDNA obtido por RT em um volume final de 25µL.

Estas reações foram processadas no termociclador (Eppendorf) programado para incubação inicial 94°C por 30s min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 20s, 60°C por 1min, após esta ciclagem, uma incubação a 72°C durante 2 min.

Antes das reações definitivas para verificação nas diferenças da expressão, foram realizadas reações testes, onde não só foi possível determinar condições ideais de iniciadores e cDNA mas também a especificidade *in vitro* dos alvos

amplificados pelos iniciadores abordado nas análises. A amplificação de um produto específico foi apurado através da análise da Curva de *Melting*, pelo programa Opticon Monitor 2.03.

Para análise da expressão gênica diferencial em PCR Tempo-Real foram realizadas reações para curva padrão, dos genes analisados, variando a massa de cDNA em 15ng, 3ng, 600pg, 120pg, 24pg e 4,8pg, em 20µL de reação que também possuía 0,2µM de cada oligo específicos (senso e anti-senso) e 1X *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Além disso, também foram realizadas reações com 1ng de cDNA seguindo similarmente o volume e as concentrações de iniciadores e *Power SYBR Green PCR Master Mix* previamente citadas. Essas reações foram realizadas em quadruplicatas para cada condição experimental, sendo estas HSC536+*fancc* e HSC536, e sob tratamento com MMC.

As reações para análise em *Real-Time* PCR foram submetidas a incubação inicial no termociclador (Chromo4<sup>TM</sup> Real-Time PCR, BioRad) de 50°C por 2min seguidos por uma de 95°C por 10min e após 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

## **4 - Resultados**

### **4.1 - Sensibilidade das células HSC536 à MMC**

As células com mutações em genes da via Fanconi possuem como uma das características fenotípicas a hipersensibilidade a agentes indutores de ligações covalentes entre as duas fitas da molécula de DNA (*Interstrand Cross-Link DNA - ICLs*), como por exemplo MMC. Diante disso, antes de todas as análises dos níveis de mRNA, era necessário verificar o fenótipo de sensibilidade a MMC das células tomando parte do tratamento para análise (*Differential Display, Northern e Real-Time PCR*) e seguindo com outra parte para controle do experimento.

Na figura 4 está o resultado dos vários experimentos realizados ao longo desse trabalho. O gráfico exibe o número de células viáveis mediante os tratamentos com 50, 100 e 300 ng de MMC por mL de meio de cultura, em relação a viabilidade das células não tratadas com MMC. As células HSC536+*fancc* (barras pontilhadas) são mais resistentes a MMC do que as células HSC536 (barras hachuradas). Com tratamento de 50 ng de MMC/mL as células HSC536+*fancc* foram 80% viáveis e as células HSC536 cerca de 60% viáveis. Para o tratamento com 100ng de MMC as células HSC536+*fancc* apresentaram cerca de 70% de viabilidade enquanto que as células HSC536 exibiram cerca de 20% de viabilidade. Já na dose de 300 ng MMC por mL de cultura, as células HSC536+*fancc* e HSC536 se mostraram bastante sensíveis 40% e 10% respectivamente, mesmo assim a HSC536+*fancc* foi mais resistente do que HSC536.

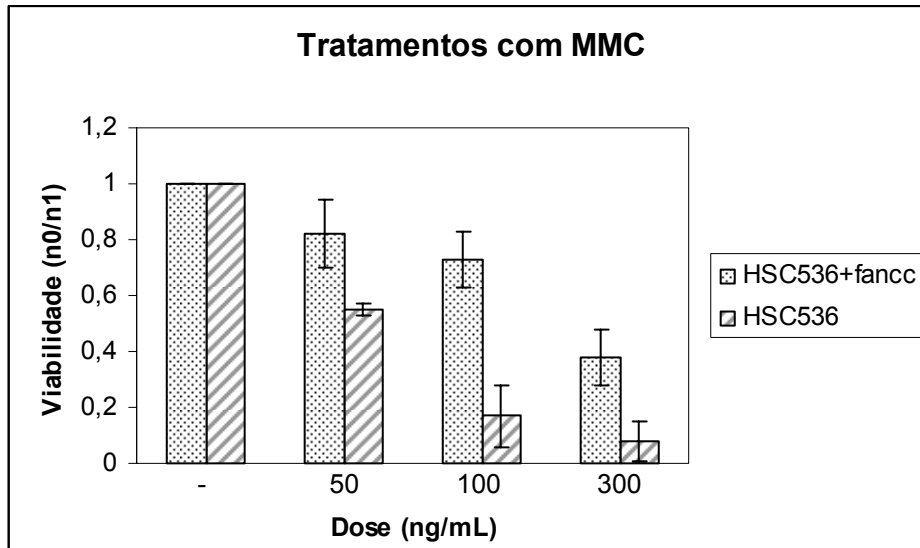


Figura 4: **Hipersensibilidade das células Fanconi a MMC.** Viabilidade determinada entre a razão células vivas tratadas (n1) e controle (n0) após 48h do término de tratamento com MMC nas concentrações de 50 (n=3), 100 (n=8), 300ng/mL (n=4).

#### **4.2 - Análise do Differential Display**

Com o objetivo analisar a diferenças nos níveis de mRNAs entre as células, HSC536+*fancc* e HSC536, tratadas ou não com MMC, foi aplicada a metodologia de *Differential Display*.

Nas figuras 5 a 11 estão as imagens dos autorradiogramas obtidos conforme dados contidos nos materiais e métodos. A primeira raia (1) contidas nas imagens representa o perfil de fragmentos de cDNA das células HSC536+*fancc*, na segunda (2) está o perfil desta mesma célula com tratamento com MMC, na terceira (3) consta o perfil de fragmentos de cDNA pertinentes as células HSC536 e por fim, na quarta raia (4) está o perfil desta última célula diante do tratamento com MMC.

Ao lado das imagens do autorradiograma estão as estimativas de aumento ou diminuição dos níveis de cDNA, que estão destacados por um retângulo. A

comparação entre os perfis de fragmentos de cDNA das células HSC536+*fancc* e HSC536 e seus respectivos tratamentos com MMC permitiu verificar que 32 fragmentos de cDNAs apresentavam-se diferenciais.

Nas células HSC536+*fancc* 15 fcDNA representam possíveis aumentos nos níveis de mRNA ocasionados pela MMC enquanto que 6 fcDNAs apresentaram diminuição em relação a MMC (tabela 7). Para as células HSC536, aparentemente 4 fcDNAs estavam aumentados com o tratamento com MMC ao passo que 3 fcDNAs foram diminuídos (tabela 7).

Adotando como referência as células HSC536, as células complementadas com o gene selvagem, HSC536+*fancc*, apresentaram 9 possíveis genes aumentados em relação a célula HSC536, enquanto que 10 genes encontravam-se inibidos. No entanto, em relação ao tratamento com MMC, possivelmente em decorrência da inativação do gene *FANCC*, a célula HSC536 reprimiu a expressão de 13 prováveis genes ao passo que 5 genes tiveram aumento na expressão (tabela 8).



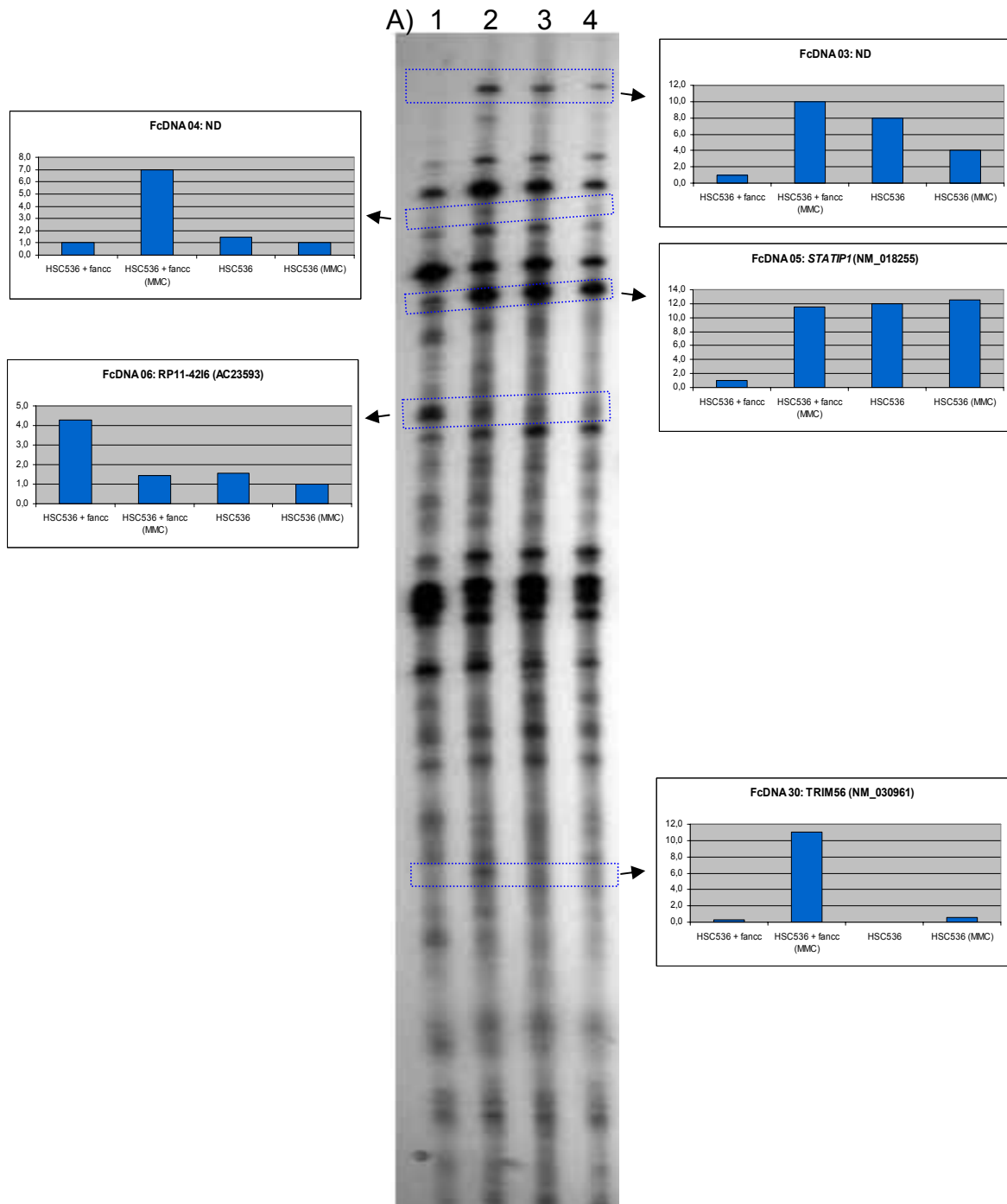


Figura 5: **Differential Display: Seção do autoradiograma e densitometria dos Fragmentos de cDNA diferenciais.** As raias correspondem ao produto das PCR radioativa de baixa estringência realizada com iniciadores HT11-C/H-AP4 em A. (1) célula HSC536+*fancc*, (2) célula HSC536+*fancc* tratada com MMC, (3) célula HSC536 e (4) célula HSC536 tratada com MMC. Os gráficos ao lado do autoradiograma estimam por densitometria da imagem dos fragmentos diferenciais (retângulo) entre as células. ND – fragmento não Identificado.

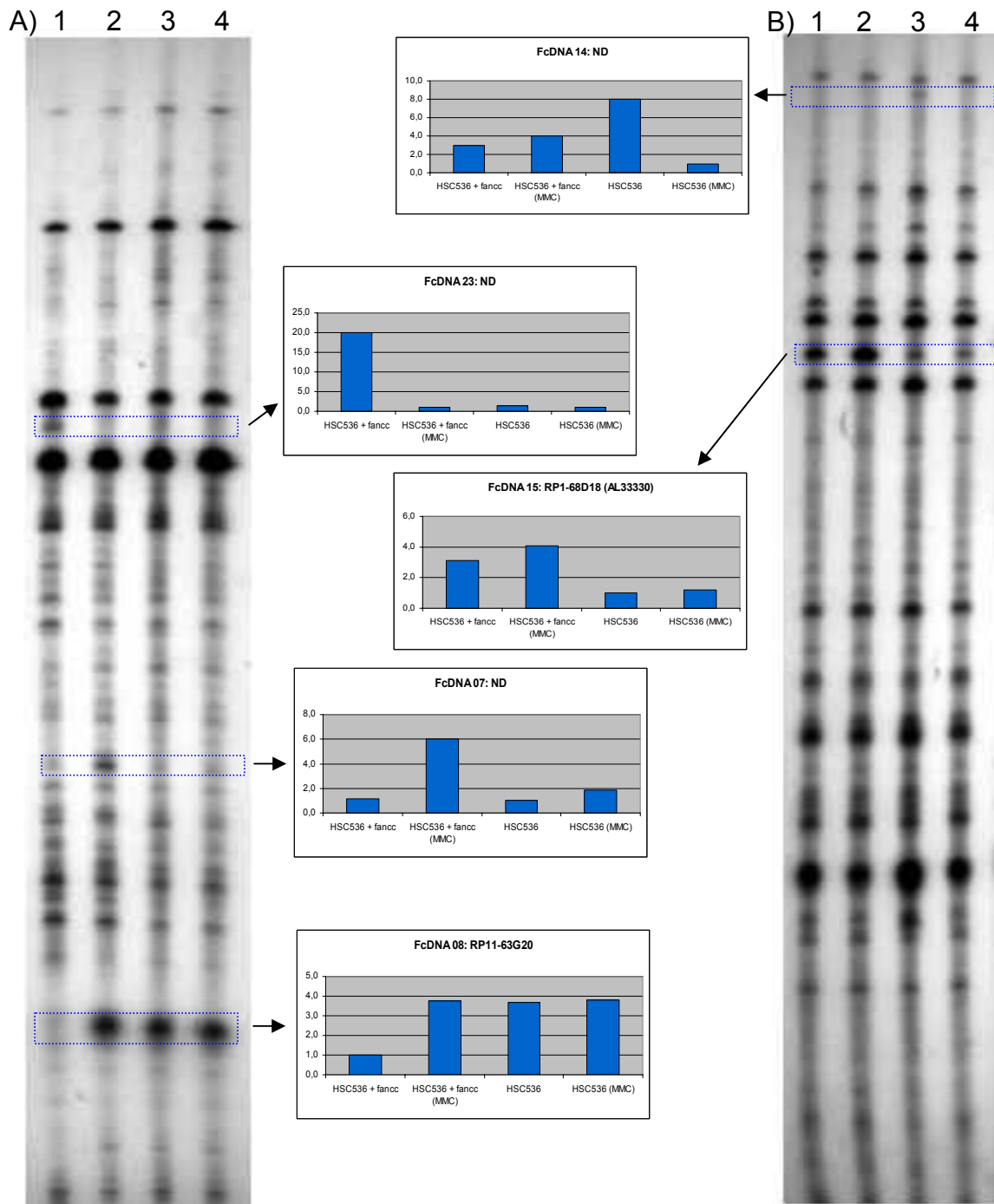


Figura 6: **Differential Display: Seção do autoradiograma e densitometria dos Fragmentos de cDNA diferenciais.** As raias correspondem ao produto das PCR radioativa de baixa estrigência realizada com iniciadores HT11-C/H-AP5 em A e HT11-G/H-AP1 em B. (1) célula HSC536+*fancc*, (2) célula HSC536+*fancc* tratada com MMC, (3) célula HSC536 e (4) célula HSC536 tratada com MMC. Os gráficos ao lado do autoradiograma estimam por densitometria da imagem dos fragmentos diferenciais (retângulo) entre as células. ND – fragmento não Identificado.

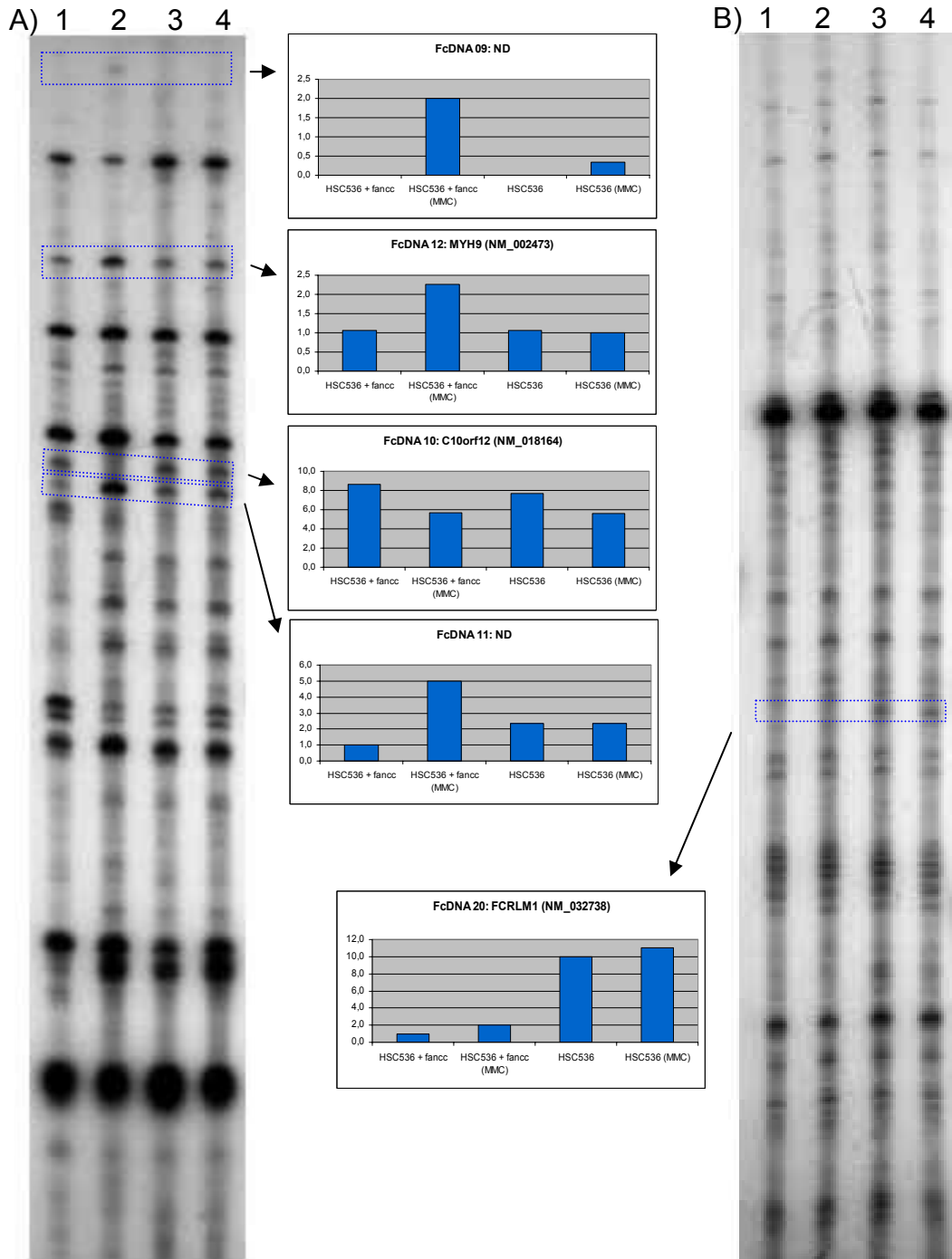


Figura 7: **Differential Display: Seção do autoradiograma e densitometria dos Fragmentos de cDNA diferenciais.** As raias correspondem ao produto das PCR radioativa de baixa estringência realizada com iniciadores HT11-C/H-AP7 em A e HT11-A/H-AP6 em B. (1) célula HSC536+*fancc*, (2) célula HSC536+*fancc* tratada com MMC, (3) célula HSC536 e (4) célula HSC536 tratada com MMC. Os gráficos ao lado do autoradiograma estimam por densitometria da imagem dos fragmentos diferenciais (retângulo) entre as células. ND – fragmento não Identificado.

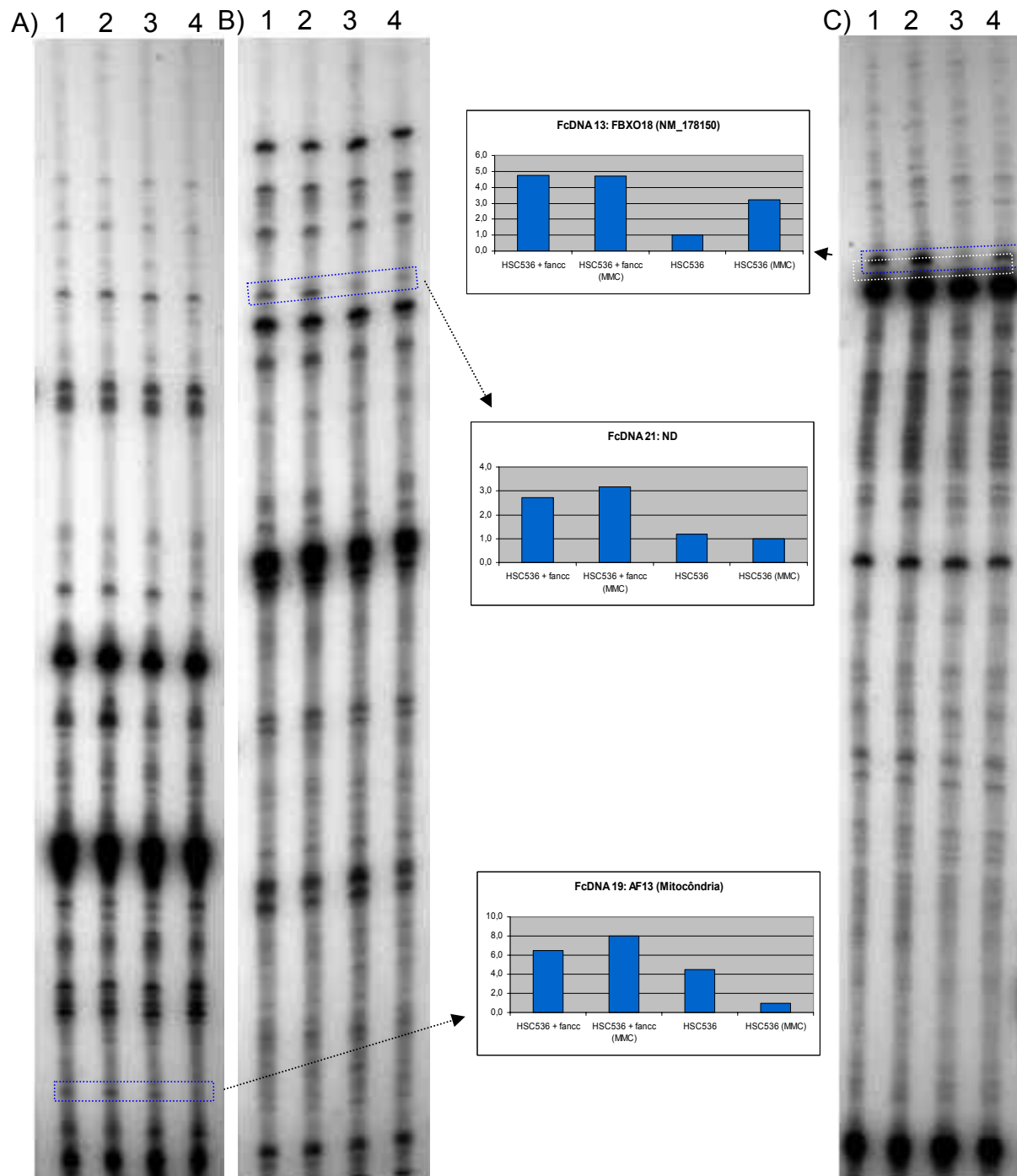


Figura 8: **Differential Display: Seção do autoradiograma e densitometria dos Fragmentos de cDNA diferenciais.** As raias correspondem ao produto das PCR radioativa randômicas com iniciadores HT11-A/H-AP7 em A, HT11-A/H-AP5 em B e HT11-A/H-AP3 em C. (1) célula HSC536+*fancc*, (2) célula HSC536+*fancc* tratada com MMC, (3) célula HSC536 e (4) célula HSC536 tratada com MMC. Os gráficos ao lado do autoradiograma estimam por densitometria da imagem dos fragmentos diferenciais (retângulo) entre as células. ND – fragmento não Identificado.

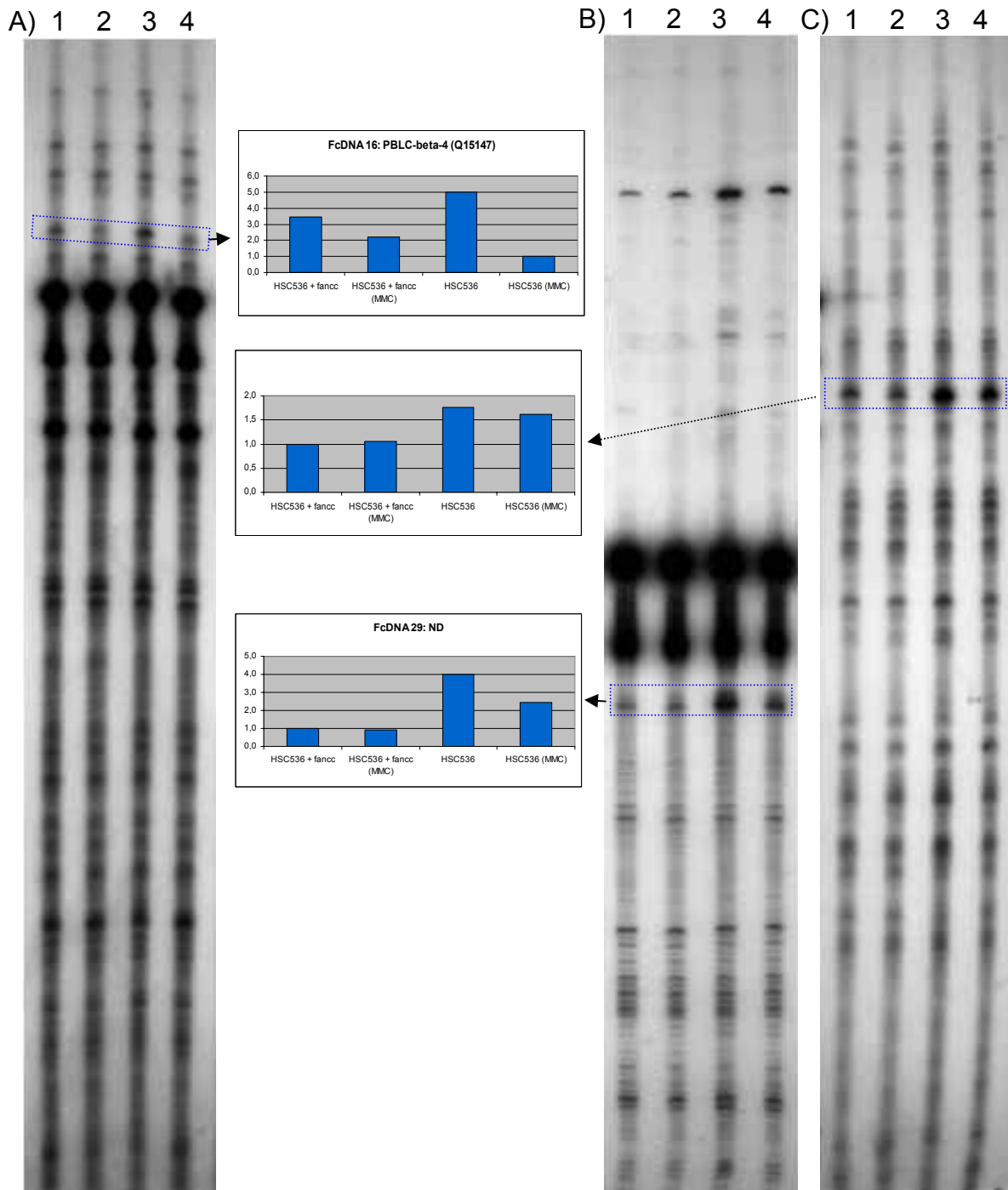


Figura 9: **Differential Display: Seção do autoradiograma e densitometria dos Fragmentos de cDNA diferenciais.** As raias correspondem ao produto das PCR radioativa de baixa estringência realizada com iniciadores HT11-G/H-AP3 em A, HT11-A/H-AP8 em B e HT11-G/H-AP5 em C. (1) célula HSC536+*fancc*, (2) célula HSC536+*fancc* tratada com MMC, (3) célula HSC536 e (4) célula HSC536 tratada com MMC. Os gráficos ao lado do autoradiograma estimam por densitometria da imagem dos fragmentos diferenciais (retângulo) entre as células. ND – fragmento não Identificado.

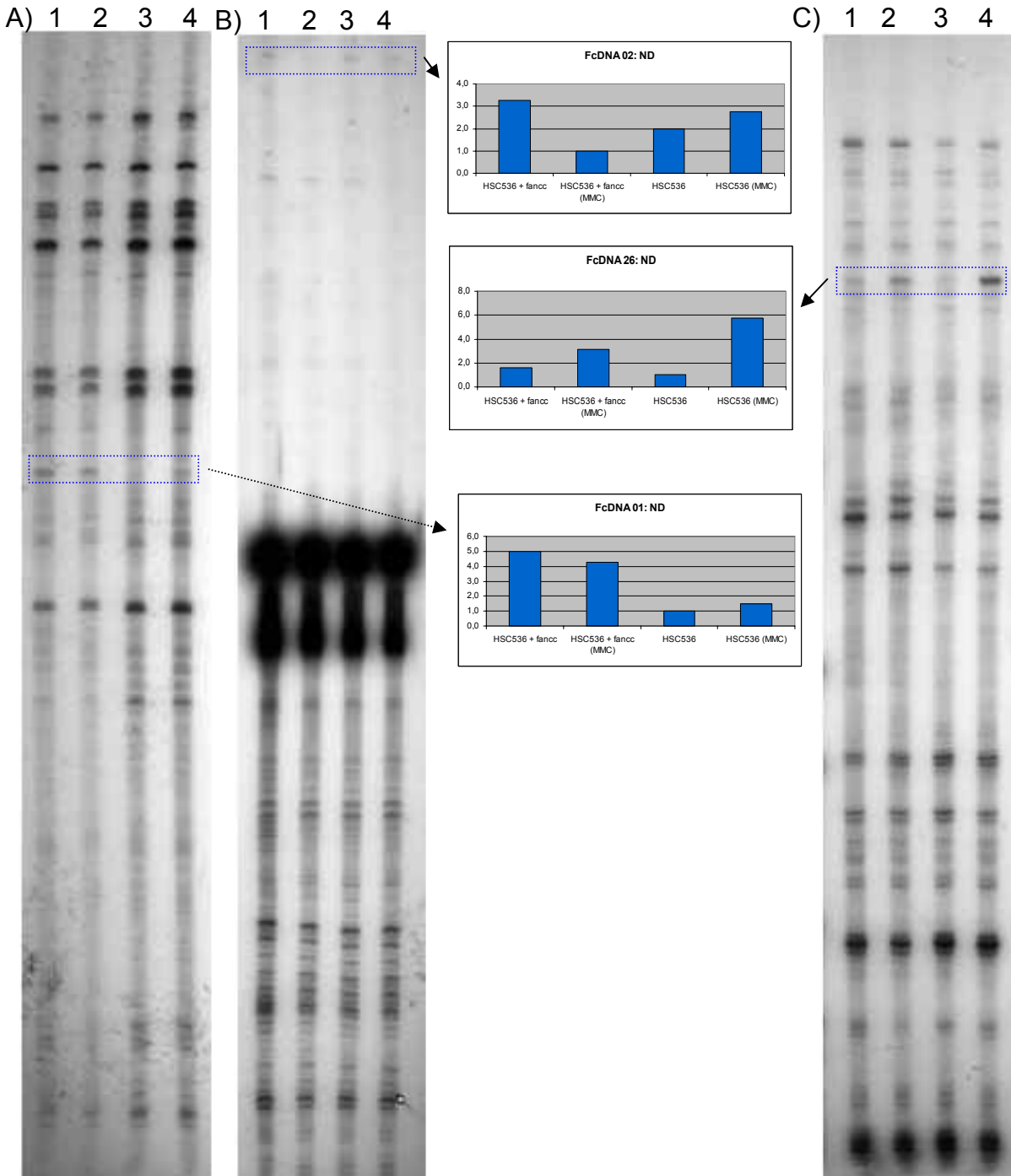


Figura 10: **Differential Display: Seção do autorradiograma e densitometria dos Fragmentos de cDNA diferenciais.** As raias correspondem ao produto das PCR radioativa de baixa estrigência realizada com iniciadores HT11-A/H-AP4 em A, HT11-G/H-AP8 em B e HT11-G/H-AP6 em C. (1) célula HSC536+*fancc*, (2) célula HSC536+*fancc* tratada com MMC, (3) célula HSC536 e (4) célula HSC536 tratada com MMC. Os gráficos ao lado do autorradiograma estimam por densitometria da imagem dos fragmentos diferenciais (retângulo) entre as células. ND – fragmento não Identificado.

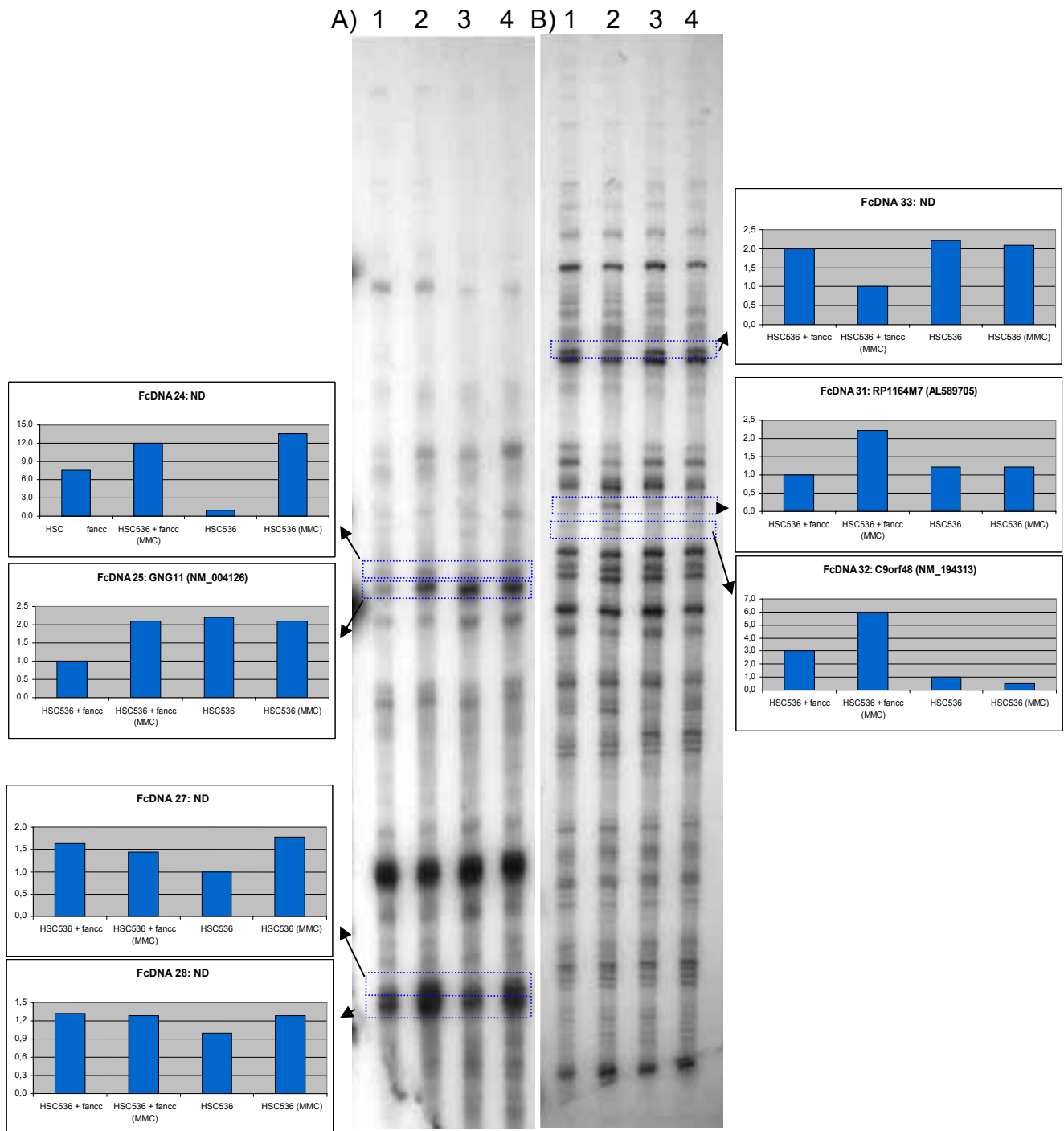


Figura 11: **Differential Display: Seção do autoradiograma e densitometria dos Fragmentos de cDNA diferenciais.** As raias correspondem ao produto das PCR radioativa de baixa estringência realizada com iniciadores HT11-C/H-AP6 em A e HT11-G/H-AP7 em B. (1) célula HSC536+*fancc*, (2) célula HSC536+*fancc* tratada com MMC, (3) célula HSC536 e (4) célula HSC536 tratada com MMC. Os gráficos ao lado do autoradiograma estimam por densitometria da imagem dos fragmentos diferenciais (retângulo) entre as células. ND – fragmento não Identificado.

<i>Differential Display</i>	cDNAs detectados (por raia)	Expressão diferencial	Amplificados	Clonados	ID	Combinação de iniciadores
DD1	190	3	3	1	-	A4, G4, A8 e G8
DD2	271	12	11	8	6	C4, C5, C7 e C8
DD3	194	3	1	1	1	A3 e C3
DD4	208	4	4	3	3	G1, G2, G3 e G5
DD5	305	3	2	2	2	A1, A2, A5, A6, A7 e C1
DD6	207	7	6	3	3	C2, C6, G6 e G7
TOTAL	1295	32	27	18	15	24

Tabela 6: **Resumo da análise numérica do DD.** DD1 ao DD6 - Quantidade de géis de poliacrilamida desnaturante e autoradiogramas gerados. (ID) clones seqüenciados e que tiveram homologia com informações disponíveis no banco de dados do genoma humano. Na última coluna está a combinação dos iniciadores utilizados nos DDs, as letras A, C e G referem-se aos iniciadores de ancoragem e os números, de 1 a 8, aos iniciadores randômicos (vide tabela 4).

	HSC536+ <i>fancc</i> (fcDNAs)	HSC536 (fcDNAs)
↑	15	4
↓	6	3

Tabela 7: **Modulação dos níveis de mRNA mediante ao tratamento com MMC.** Indução (↑) ou inibição (↓) dos níveis de mRNA: Estimativa obtida através da densitometria dos fragmentos de cDNA (fcDNA) diferenciais no autoradiograma, quando comparados as células HSC536+*fancc* e HSC536 com seus respectivos tratamentos.



MMC (100ng/mL)		HSC536+ <i>fancc</i> versus HSC536 (fcDNA)
-	↑	9
-	↓	10
+	↑	5
+	↓	13

Tabela 8: **Modulação dos níveis de mRNA nas células HSC536.** A indução (↑) ou inibição (↓) refere-se a linhagem HSC536 em relação a HSC536+*fancc* quando tratadas (+) ou não (-) com MMC. Estimativa obtida através da densitometria dos fcDNAs diferenciais no autoradiograma. Por exemplo, na última linha 13 genes foram inibidos na linhagem HSC536 em relação as células HSC536+*fancc* na condição de tratadas com MMC.

### **4.3 - Seqüenciamento: Identificação dos fcDNAs**

Os fcDNAs selecionados como diferenciais foram recuperados do gel, amplificados novamente por PCR, clonados no plasmídeo pGEM-T (Promega), transformados, recuperados e submetidos a reação de seqüenciamento. As seqüências e os cromatogramas obtidos foram analisadas no programa BioEdit. Posteriormente submetidas à identificação através de homologia a seqüências disponíveis no banco de dados do genoma humano utilizando a ferramenta *on line* BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), 2006).

As homologias encontradas em relação às seqüências obtidas possuíram elevadas similaridades com as já descritas sobre o genoma humano. Na tabela 9 encontra-se um resumo e identificação das homologias obtidas a partir do resultado do seqüenciamento, enquanto que na tabela 9 os resultados estão dispostos conforme suas funções celulares.

Resultado da Homologia (BLAST) <sup>1</sup>	Nº. Acesso <sup>1</sup>	Identidade <sup>1</sup>	e-value <sup>1</sup>	Função <sup>2</sup>	Processo celular <sup>2</sup>
<i>Homo sapiens</i> signal transducer and activator of transcription 3 interacting protein 1 (STATIP1), mRNA	NM_018255	98%	6e-150	Transdutor de sinal e ativador transcricional	Nefrogenese, proliferação, inflamação e oncogenese.
<i>H. sapiens</i> chromosome 12 open reading frame 11, mRNA	NM_018164	97%	1e-88	ND	ND
<i>H. sapiens</i> myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle (MYH9), mRNA	NM_002473	99%	1e-129	Estrutural	Diferenciação celular
<i>H. sapiens</i> F-box protein, helicase, 18 (FBXO18), transcript variant 2, mRNA	NM_178150	100%	2e-04	Helicase	Replicação e reparo de DNA, recombinação
<i>H. sapiens</i> Phospholipase C-beta-4 (PLCB4), mRNA	Q15147	95%	2e-26	Transdução de sinal	Sinalização celular
<i>H. sapiens</i> cytochrome c oxidase subunit Vb (COX5B), mRNA	NM_001862	97%	2e-93	Receptor final de elétrons	Respiração celular
<i>H. sapiens</i> isolate AF13 mitochondrion	DQ112962	93%	7e-16	ND	ND
<i>H. sapiens</i> Fc receptor-like and mucin-like 1 (FCRLM1), mRNA	NM_032738	98%	6e-59	Receptor de Membrana	Resposta Imune
<i>H. sapiens</i> guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11 (GNG11), mRNA	NM_004126	99%	2e-93	Receptor de Membrana	Sinalização celular
<i>H. sapiens</i> tripartite motif-containing 56 (TRIM56), mRNA	NM_030961	100%	3e-51	Ubquitina ligase	Resposta Imune
<i>H. sapiens</i> chromosome 9 open reading frame 48 (C9orf48), mRNA	NM_194313	99%	1e-66	ND	ND
Human DNA clone RP1-68D18	AL133330	95%	8e-78	ND	ND
<i>H. sapiens</i> BAC RP11-427I6	AC023593	96%	2e-15	ND	ND
Human DNA clone RP11-63G20	AL391827	97%	1e-28	ND	ND
Human DNA clone RP11-64M7	AL589705	99%	1e-82	ND	ND

Tabela 9: **Resultado da homologia das seqüências obtidas dos fcDNAs diferenciadas da análise do DD:** Fonte 1 - [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e 2 - [www.hprd.org/](http://www.hprd.org/). ND – não definido; BAC – *bacterial artificial chromossome*.

#### 4.4 - Northern Blot: expressão diferencial de *fcDNA21* e *fcDNA10/C12orf11*

O *Differential Display* é uma metodologia que pode gerar falsos-positivos, sendo assim necessário aplicar outras técnicas para validar os resultados encontrados. Diante disso, foi utilizada a técnica de *Northern Blot* para confirmar os resultados obtidos com o DD. Na figura 12 encontra-se os resultados no *Northern* utilizando como sonda o produto da PCR dos fragmentos de cDNA 21 e 10.

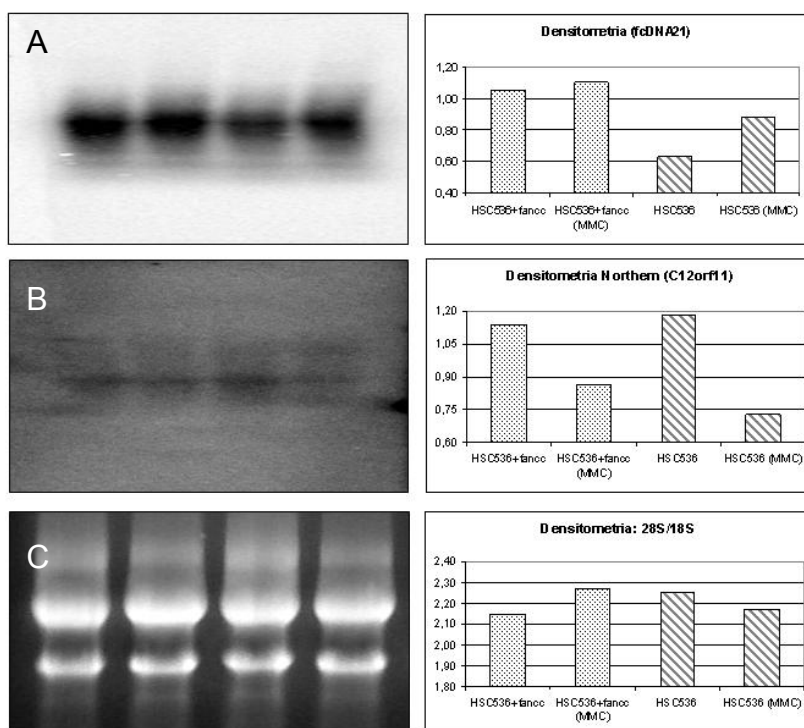


Figura 12: **Northern Blot** dos fcDNAs referentes aos genes *fcDNA21* e *fcDNA10/C12orf11*. A) Sonda *fcDNA21* feita a partir da combinação dos iniciadores H-T<sub>11</sub>A com H-AP5. B) Sonda *fcDNA10/C12orf11* combinando aos iniciadores H-T<sub>11</sub>C com H-AP7. C) controle de massa de RNA aplicado no gel de agarose/formaldeído 1,0% corado com Brometo de etídeo. Densitometria realizada a partir das imagens das membranas e do gel agarose/formaldeído utilizando o programa ImageQuant (Molecular

Em A, os níveis de mRNA referentes a *fcDNA21*, estão menores nas células HSC536 em relação as células HSC536+*fancc*, além disso os níveis aparentemente não alteraram em relação ao tratamento com MMC nas células HSC536+*fancc*. Em B, ambas as células possuíam menor quantidades de mRNA da ORF11 quando tratadas com MMC em relação as células não tratadas. Em C,

está o resultado da eletroforese do RNA total extraído dessas células que foi realizada no mesmo gel de onde resultaram os *Northern* de cDNA21 e cDNA10/C12orf11. Os resultados obtidos pelo *Northern* são similares aos encontrados anteriormente com a metodologia de DD.

#### **4.5 - Análise da expressão diferencial dos genes *COX5B*, *STAT1P1*, *TRIM56*, *FBXO18* e *FcRLM1***

Dentre os fcDNAs selecionados como diferenciais no *Differential Display*, os que tiveram homologia com os genes *COX5B* (fcDNA17), *STAT1P1* (fcDNA5), *TRIM56* (fcDNA30), *FBXO18* (fcDNA13) e *FcRLM1* (fcDNA20) foram selecionados para análise da expressão diferencial através da PCR em Tempo Real. Estes genes encontram-se envolvidos em processos celulares condizentes com os dados descritos na literatura sobre a via Fanconi, mas ainda não relacionado diretamente com esta via.

A análise em tempo real utilizando o corante fluorescente *SYBR<sup>®</sup> Green* requer que os iniciadores sejam específicos a seus alvos, o que pode ser determinado tanto através de análises *in silico*, verificando homologia através do programa BLAST, quanto através da curva de *Melting*, que pode ser obtida ao fim da reação de PCR em tempo real pelo programa utilizado na análise da reação. Por meio do BLAST, foi identificado que todos os iniciadores somente eram homólogos aos seus alvos. Além disso, os gráficos das curvas de *Melting* mostraram picos únicos em relação aos iniciadores e seus amplicons (anexo 1).

Tendo como controle de massa os níveis de mRNA de *beta-Actina*, os níveis de mRNA para o gene *COX5B* encontra-se aumentado, cerca de 20%, na

linhagem HSC536 enquanto que não alterou em relação ao tratamento com MMC quando comparada com a linhagem HSC536+*fancc* (Figura 13). Através da PCR em tempo real, os resultados obtidos para verificação dos níveis de mRNA de FCRLM1, foram semelhantes aos obtidos para COXVb, sendo que a quantidade de mRNA nas células HSC536 foi cerca de 40% maior comparados as células HSC536+*fancc*. Os resultados, tanto para COXVb quanto para FCRLM1, sugerem que não há alterações significativas nos níveis desses RNA mensageiros quando essa células são tratadas com MMC (Figura 14). Os resultados obtidos para esses dois dois foram similares aos encontrados pelo DD.

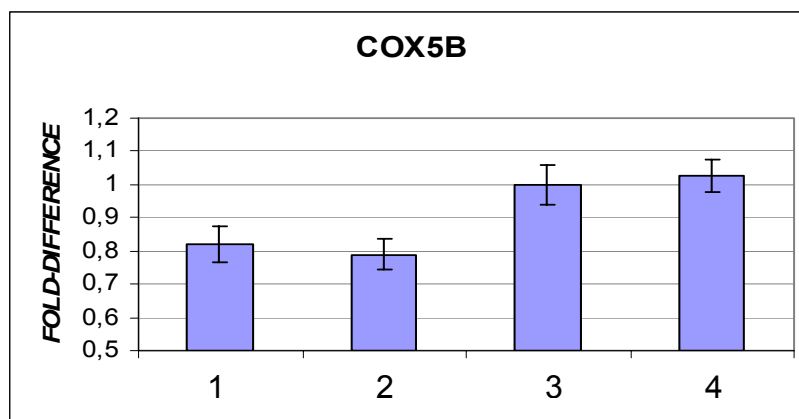


Figura13: **Análise por Real-Time PCR dos níveis de mRNA de COX5B.** Diferenças nos níveis de mRNA (*fold-difference*) nas células HSC536+*fancc* (1), HSC536+*fancc* tratada com MMC (2), HSC536 (3) e HSC536 tratada com MMC (4).

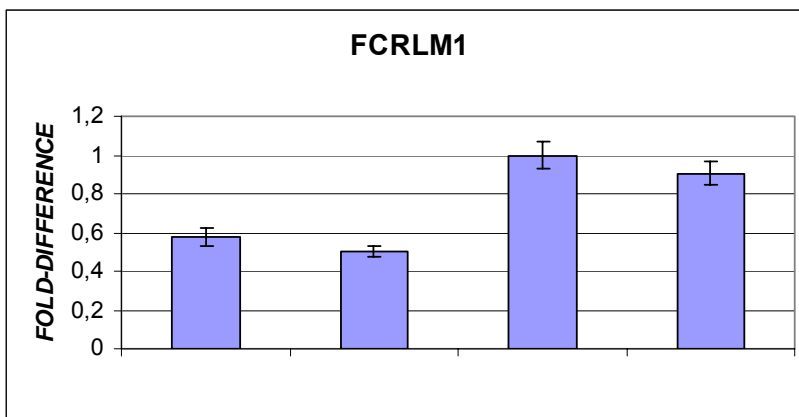


Figura 14: **Análise por Real-Time PCR dos níveis de mRNA de FCRLM1.** Diferenças nos níveis de mRNA (*fold-difference*) nas células HSC536+*fancc* (1), HSC536+*fancc* tratada com MMC (2), HSC536 (3) e HSC536 tratada com MMC (4).

Os níveis do mRNA de TRIM56 não variou significativamente entre as células HSC536+*fancc* e HSC536 e nem mesmo diante de seus respectivos tratamentos (Figura 15), o que não ocorreu no DD, onde TRIM56 estava aumentado somente nas células HSC536+*fancc* (figura 5).

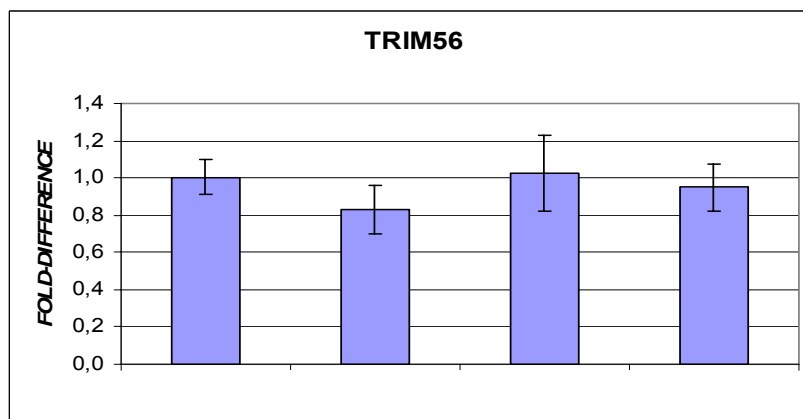


Figura 15: **Análise por Real-Time PCR dos níveis de mRNA de TRIM56.** Diferenças nos níveis de mRNA (*fold-difference*) nas células HSC536+*fancc* (1), HSC536+*fancc* tratada com MMC (2), HSC536 (3) e HSC536 tratada com MMC (4).

Os níveis de mRNA de *FBXO18* estão aumentados, cerca de 35%, nas células HSC536 em relação as HSC536+*fancc*, ao passo que, não há alterações nos níveis desse RNA mensageiro mediante o incubação com MMC (Figura 16).

Dentre os genes analisados por PCR em Tempo Real, os níveis de mRNA do gene *STAT1P1* estão aumentados nas células complementadas, HSC536+*fancc*, em relação as células HSC536, onde os níveis permaneceram semelhantes aos da beta-actina, que foi utilizada para controle de massa. O *FBXO18* no DD, estava somente diminuído nas células HSC536 (figura 8) enquanto que *STAT1P1* somente nas células HSC536+*fancc* (figura 5)

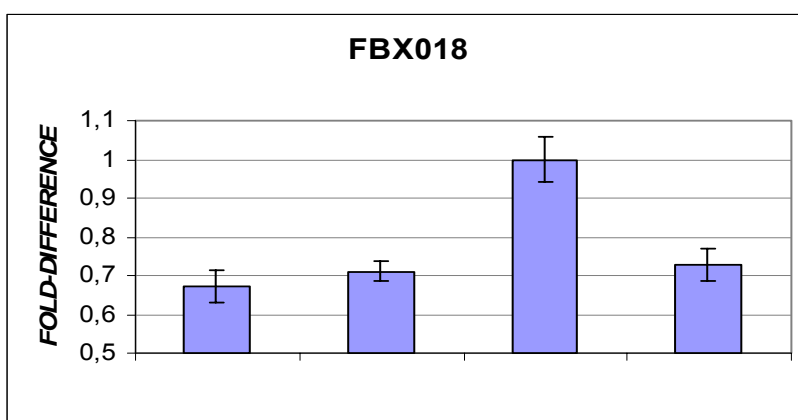


Figura 16: **Análise por Real-Time PCR dos níveis de mRNA de *FBXO18***. Diferenças nos níveis de mRNA (*fold-difference*) nas células HSC536+*fancc* (1), HSC536+*fancc* tratada com MMC (2), HSC536 (3) e HSC536 tratada com MMC (4).

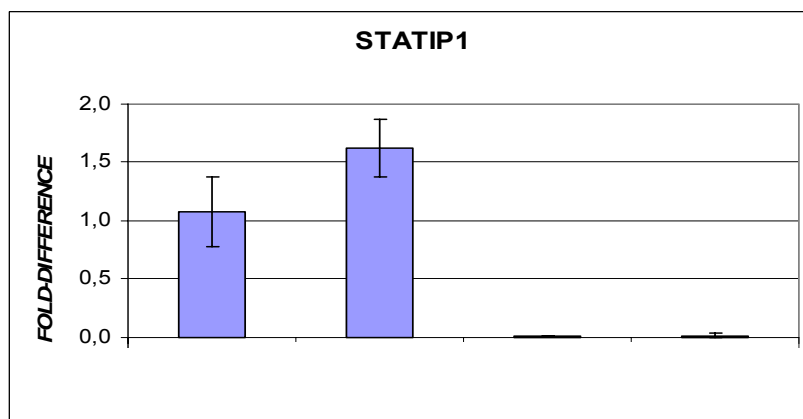


Figura 17: **Análise por Real-Time PCR dos níveis de mRNA de *STATIP1***. Diferenças nos níveis de mRNA (*fold-difference*) nas células HSC536+*fancc* (1), HSC536+*fancc* tratada com MMC (2), HSC536 (3) e HSC536 tratada com MMC (4).

## **5 - Discussão**

### **5.1 - Anemia de Fanconi**

A anemia de Fanconi foi descrita em 1927 pelo pediatra Guido Fanconi, caracterizada pela pancitopenia e más formações congênitas. Recentemente o modelo de células deficientes em genes Fanconi tem sido uma importante ferramenta não só para o estudo dos mecanismos de reparo de DNA, mas também para a compreensão do desenvolvimento de certos tipos de cânceres (Houghtaling, *et al.* 2003 e 2005), pois esses genes têm se mostrado essenciais para supressão de tumores.

Além disso, esses genes também são essenciais para o perfeito funcionamento dos pontos de checagem, *checkpoint*, durante a progressão do ciclo celular. Mais especificamente, o gene *FANCC* para o *checkpoint* entre as fases G2/M (Freie, *et al.* 2004; Gallmeier, *et al.* 2006) e *FANCD2* para fase S (Taniguchi, *et al.* 2002) do ciclo celular. A integridade dos genes Fanconi também são essenciais para o controle da iniciação da replicação (Zhu e Dutta, 2006).

Além dos processos descritos acima, as proteínas Fanconi também se apresentam relacionadas ao estress oxidativo e apoptose (Cumming, *et al.* 2001; Saadatzadeh, *et al.* 2004; Pang, *et al.* 2002). Estas também podem atuar como moduladoras da expressão de genes relacionados aos processos de resposta-imune/inflamação (Fagerlie, *et al.* 2004; Zanier, *et al.* 2004).

A maior parte das proteínas que compõem a via Fanconi e suas interações com processos celulares, distintos de Reparo de DNA, foi descrito recentemente. Entretanto, apesar de ser uma doença com baixa incidência na população mundial (Joenje e Patel, 2001) os achados em nível molecular sobre via Fanconi têm sido



de enorme importância para desvendar e entender a biologia dos eventos previamente descritos, sobretudo câncer, que acomete milhões de pessoas.

## **5.2 - Differential Display**

A técnica de *Differential Display* (DD) desde sua criação vem sendo empregada em inúmeros trabalhos de análise de expressão gênica diferencial. Apesar de ser uma técnica capaz de gerar falsos positivos, é cada vez mais crescente o número de publicações e citações relacionadas a esta metodologia, sendo significativamente superior em relação as técnicas similares, como SAGE, *Microarray*, cDNA-RFLP, biblioteca subtrativa, entre outras.

O DD tem sido uma ótima ferramenta para dar início a uma investigação científica em nível de expressão gênica. Com base nisso, trabalhos utilizando a metodologia de DD têm sido publicados em revistas de impacto considerável, destacando o trabalho do Fukuhara e colaboradores na revista *Science* em 2005, que começou através da análise da expressão diferencial utilizando DD.

Os trabalhos que já existem aplicando DD em modelos Fanconi, foram realizados ou com combinações diferentes aos utilizados neste trabalho ou com linhagens fibroblatos Fanconi. Além disso, esses trabalhos pouco acrescentaram para o entendimento das bases moleculares da complexa rede de processos celulares que as proteínas Fanconi participam.

As imagens do autorradiograma obtidas com esse trabalho mostram que as linhagens analisadas são bastante semelhantes em relação a expressão gênica, uma vez que são isogênicas, sendo assim, as poucas diferenças encontradas podem ser em função da mutação do gene *FANCC* e/ou decorrentes do

tratamento com MMC. O DD também indicou ser bastante eficiente na análise da variação da expressão gênica, pois mesmo através de *microarray*, que permitiu a análise de 18.000 genes, somente 35 encontravam-se diferentes entre a linhagem celular Fanconi e complementada com gene selvagem (Zanier, *et al.* 2004).

Segundo os criadores da metodologia do DD, Liang e Pardee 1994, estima-se que, através do número de combinações de iniciadores de ancoragem com os randômicos, foi possível 65% do total de mRNA presentes no momento da extração com reagente TRizol.

Através do DD, foi possível identificar 32 fragmentos de cDNAs (fcDNA) que estavam diferenciadas entre as linhagens HSC536+*fancc* e HSC536 tratadas ou não com MMC. Dentre as variações encontradas, o maior número de alterações ocorreu nas duas linhagens tratadas com MMC em relação as não tratadas (tabela 7 e 8), sendo que 15 fcDNAs foram induzidos na linhagem HSC536+*fancc* enquanto que 13 fcDNAs foram inibidos na HSC536. A maior parte dessas variações correspondem ao mesmo fcDNA, entretanto a presença do gene *FANCC* deve ser importante para expressão desses cDNAs em resposta ao tratamento com MMC.

Em um primeiro momento, os 27 cDNAs recuperados foram amplificados sucessivamente para experimentos que confirmassem os resultados obtidos no DD. As clonagens foram realizadas com grande sucesso, pois todos os 18 cDNAs restantes foram inseridos no pGEM-T e recuperados após transformação. No entanto, somente 15 cDNAs foram identificados através de homologia as seqüências existentes no banco de dados do genoma humano.

Antes da verificação das alterações na expressão gênica através da PCR em tempo real, foram realizados experimentos de *Dot-blot* e *Northern Blot*. Através da primeira técnica citada não foram obtidas hibridizações significativas, salvo para o cDNA da actina. Com o *Northern*, somente os cDNAs 21 e 10 reproduziram as diferenças encontradas com DD, mais ainda são necessários mais experimentos para validação deste resultados.

Diante dos resultados obtidos com o *Dot-blot* e com *Northern*, foi decidido analisar tais diferenças encontradas através da PCR em tempo real. No entanto, foram selecionados, dentre os 11 genes identificados, os que estavam mais os que possuíam maior relação aos processos celulares descritos sobre anemia de Fanconi, são eles *COX5b*, *FCRLM1*, *FBXO18*, *STATIP1* e *TRIM56*.

### **5.3 - Genes encontrados versus Anemia de Fanconi**

Como descrito anteriormente, a via Fanconi mostra-se envolvida principalmente em processos relacionados a reparo de lesões no DNA, mas também pode participar de diversos outros processos celulares tais como, metabolismo de oxigênio (Cumming, *et al.* 2001; Kruyt, *et al.* 1998), controle do ciclo celular (Freie, *et al.* 2004; Seyschab, *et al.* 1993), inflamação (Zanier, *et al.* 2004) e transcrição gênica (Pang, *et al.* 2000 e 2002). Com base nessas características, a maior parte dos genes identificados nesse trabalho podem ter suas funções intrinsecamente relacionadas a estes processos celulares. Cabe a validação dessas alterações na expressão dos mesmos para incluir um importante e inédito dado na literatura com relação à via Fanconi.

As DNA-helicases, como FBXO18, encontram-se envolvidas em processos de replicação, recombinação e reparo de DNA. No entanto, os membros da família de helicase FBH1 (*F-Box DNA Helicase*), a qual este gene pertence, são as únicas envolvidas na regulação do ciclo celular, promovendo a ligação de ubiquitina em proteínas para degradação (Kim, *et al.* 2002). Nossos resultados sugerem que o cDNA correspondente ao gene *FBXO18* esteja inibido somente na linhagem HSC536 não incubada com MMC.

Adotando o resultado da PCR em Tempo Real como válida, por ser uma técnica mais confiável e específica, podemos propor que o aumento dos níveis de mRNA dessa helicase possivelmente esteja relacionada com as quebras cromossômicas espontâneas que ocorrem em detrimento de mutações em genes Fanconi. Provavelmente essas aberrações estão requerendo a todo o momento sistema de recombinação e reparo atuando.

O gene *MYH9* codifica cadeia pesada da miosina não relacionada especificamente com tecidos musculares (Saez, *et al.* 1990). Este gene pode ser induzido em resposta a interferons, os quais estimulam a expressão desse gene através da região promotora IRF (*Interferon Response Factor*), encontrada próxima ao início da transcrição. Além disso, *MYH9* é expresso durante a diferenciação de células HL-60 em macrófagos sob estímulo de Forbol-ester TPA. Somente ocorre tal diferenciação se a seqüência promotora IRF estiver integra (Chung e Kawamoto, 2004).

Similarmente como ocorre em pacientes Fanconi, indivíduos portadores de mutações envolvendo no gene *MYH9* também desenvolvem anormalidades hematológicas (D'Apolito, *et al.* 2002). Além disso, camundongos mutantes

heterozigotos para *Myh9* apresentam anormalidades tanto hematológicas quanto nefrológicas (Matsushita, *et al.* 2004). De acordo com nossos resultados, o cDNA que apresentou homologia ao gene *MYH9* apresenta sua expressão aumentada somente na linhagem corrigida (HSC536+*fancc*), e desta forma podemos criar a hipótese de que talvez a inativação da via Fanconi possa modular a expressão de *MYH9* e que tais alterações se relacione ao desenvolvimento de anemia observado nos pacientes Fanconi.

Além de genes já caracterizados, em nossos resultados encontramos duas ORFs, *C12orf11* e *C9orf48*, que ainda não tem função definida. A ORF *C12orf11* de acordo com predições de alguns programas para gerar possíveis proteínas a partir de mRNA, traduz uma proteína hipotética identificada como FLJ10637. Já a ORF *C9orf48*, de acordo com dados dispostos na Internet ([www.hprd.org](http://www.hprd.org)), esta encontra-se, ainda que timidamente, descrita no processo de crescimento celular. Através dos resultados obtidos com DD, *C12orf11*, apresenta-se inibida nas duas linhagens sob tratamento em relação as linhagens não tratadas, o mesmo resultado foi obtido através do *Northern Blot*. Enquanto que *C9orf48*, apresentou-se aumentada apenas na linhagem Fanconi corrigida (HSC536+*fancc*).

As homologias obtidas em clones e BACs, assim como as ORFs anteriores, ainda podem aumentar o número de genes e sua relação com a via Fanconi a partir do momento que estes possam ser identificadas e melhor caracterizados. As últimas buscas no BLAST foram realizadas em agosto de 2006, e até esse momento os dados permaneceram como estão descritos.

FCRLM1 um receptor específico de célula B, participa do processo de diferenciação e ativação dessas células (Masuda, *et al.* 2005). Também tem sido

encontrado relacionado a linfomas originados a partir de células B e em melanomas (Facchetti, *et al.* 2002; Inozume, *et al.* 2005). Além disso, esse gene parece estar relacionado a processos inflamatórios, pois indivíduos portadores de artrite reumatóide, inflamação crônica das articulações, possuem este gene cerca de três vezes mais expresso quando comparados com indivíduos saudáveis (Davis, *et al.* 2006). Diante da avaliação do DD e da PCR em tempo real, os níveis do fragmento de cDNA de FCRLM1 encontra-se aumentado na linhagem HSC536 e tratada quando comparada com a complementada. Alguns trabalhos sobre AF comentam sobre a possibilidade de mutações nos genes Fanconi promova um caráter pró-inflamatório nestas células (Zanier, *et al.* 2004; Fagerlie, *et al.* 2004). Sendo assim provavelmente este gene seja mais um indicativo para tais suposições.

STATIP1 (*signal transducer and activator of transcription interact protein 1*) foi descrita como componente do complexo da RNA polimerase II (Hawkes, *et al.* 2000) e parece modular a ativação da proteína STAT3, na via de sinalização JAK/STAT, ligando-se a esta quando não fosforilada (Collum, *et al.* 2000). Membros desta via participam de diversos processos celulares tais como, nefrogenese, proliferação celular, inflamação e oncogenese (Collum, *et al.* 2000). Além disso, proteínas desta via estão envolvidas com reparo de lesões de DNA, atuando no controle do ciclo celular ou alvo da cinase ATM (Townsend, *et al.* 2005; Zhang, *et al.* 2003). Da mesma forma que na anemia de Fanconi, a proteína STAT3 apresenta se relacionada, clínica e molecularmente, tanto com tumores de cabeça e pescoço (HSNCC) quanto leucemias (Benekli, *et al.* 2003). Esses tipos

de neoplasias são as mais comuns encontradas em pacientes Fanconi e em ambas neoplasias a proteína STAT3 encontra-se constitutivamente ativada.

O gene *TRIM56* faz parte de uma família de proteínas definidas pela presença do *tripartite motif* composto por um domínio RING, até dois motivos B-box e uma região *coiled-coil*. Estas proteínas encontram-se envolvidas com apoptoses, regulação do ciclo celular e em resposta a infecções virais. Além disso, membros dessa família protéica podem estar implicados em processos de ubiquitinação através da atividade E3 ligase que é conferida ao domínio RING *finger* (Meroni e Diez-Roux, 2005).

Citocromo C Oxidase (COX) faz parte da cadeia transportadora de elétrons onde é a proteína acceptora final de elétrons, essencial para geração do gradiente de prótons entre a matriz e a espaço entre membranas da mitocôndria. Esta enzima é constituída de 13 subunidades, onde 10 são traduzidas a partir de genes encontrados no genoma mitocondrial e 3 no genoma celular, que dentre estes está a subunidade Vb (Lomax, *et al.* 1991). Além disso, a COXVb também está envolvida com absorção de açúcares e com metabolismo de oxigênio, e no mesmo trabalho foi mostrado que a expressão de *COXVb* pode ser regulada pelo co-repressor transcricional RIP140, um receptor nuclear envolvido no metabolismo de lipídeos (Powelka, *et al.* 2006). Através do DD e pela PCR em tempo real, o gene para *COXVb* está mais expresso na linhagem que manteve o fenótipo Fanconi em relação a complementada.

As fosfolipases C (PLC) são enzimas fundamentais para metabolismo do fosfatidilinositol em inositol-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Estes dois produtos atuam como moléculas mensageiras secundários utilizados na

transdução de sinal em vários processos celulares. A proteína G é a responsável por dar início a transdução do sinal, através da isoforma PLC-beta 4, PLC4. Um dos principais alvos dessa via é a liberação de cálcio estocado nas organelas e regulação da proliferação celular (Litosch, *et al.* 2002). Além disso, as moléculas de fosfato-insitol mostraram-se capazes de atuar na modulação da expressão gênica (Oshea, *et al.* 2003).

As proteínas G participam de processos de sinalização celular dependentemente de GTP, tais como tráfego intracelular de vesículas, interação do citoesqueleto com a membrana, transdutores e ativadores transcricionais (Lodish, *et al.* 2004). O gene *GNG11* (**G**uanine **n**ucleotide **b**inding **p**rotein **g**amma 11) codifica a subunidade gamma da proteína G que estimula especificamente a proteína Phospholipase C (Lodish, *et al.* 2004). Aparentemente, os fcDNAs correspondentes os genes *PLC4* e *GNG11*, estão aumentados na linhagem HSC536 em relação a linhagem HSC536+*fancc*, talvez tal resultado seja um bom indicativo, pois ambas as proteínas estão envolvidas na mesma via de sinalização.

#### **5.4 - PCR em Tempo Real**

A PCR em tempo real (QRT-PCR) é uma adaptação da clássica ferramenta de PCR que permite acompanhar a cada ciclo a amplificação do DNA alvo através de corantes fluorescentes. O corante *SYBR Green*, liga-se a fitas duplas de DNA permitindo determinar a quantidade de moléculas de DNA sintetizadas a cada ciclo de amplificação. Este corante tem sido usado como primeiro passo para análise das diferenças na expressão gênica, antes de adotar o sistema da *TaqMan*, que embora mais específico também é mais oneroso.



O padrão da expressão dos genes *COX5b*, *FCRLM1*, *FBXO18*, *STATIP1* e *TRIM56* foram analisados através da metodologia de PCR em Tempo Real. Os oligonucleotídeos iniciadores, para os respectivos genes, foram elaborados com base na seqüência dos mRNAs dispostos no banco de dados do genoma humano e a especificidade deles, em relação ao gene alvo, foram avaliadas *in silico* e *in vitro*.

As diferenças encontradas através da PCR em tempo real para os genes *COX5b* e *FCRLM1* são semelhantes às apresentadas pelo DD. No entanto, para termos certeza que tais variações, mesmos que similares nos dois experimentos, é necessário um número maior de replicatas experimentais para que essas diferenças sejam consideráveis estatisticamente.

O estudo das variações da expressão gênica dos genes *TRIM56*, *FBXO18* e *STATIP1* através da PCR em tempo real produziu resultados distintos dos esperados. No caso de *TRIM56*, nenhuma variação significativa foi observada, evidenciando um caso de falso positivo (figura 15).

Por outro lado, os padrões de expressão encontrados para os genes *FBXO18* e *STATIP1* através da metodologia do DD são contrários aos obtidos com PCR em tempo real. O gene *FBXO18* que estava inibido na linhagem HSC536 no DD (Figura 8) apresentou expressão aumentada quando analisado por PCR em tempo real. Além disso, *STATIP1* parecia estar inibido nas células HSC536+*fancc* (figura 5). Entretanto, a expressão deste gene é visivelmente aumentada quando analisado através de PCR em Tempo Real nestas células (figura 17).

Não obstante, a técnica de PCR em tempo real é capaz de analisar com segurança variações na expressão gênica de maneira específica e, desta forma, os resultados alcançados com esta metodologia devem ser melhor considerados. Mais diretamente, os valores encontrados através da PCR em tempo real serão tomados como verdadeiros, e mediante a um maior número de replicatas experimentais, será assumido que estes genes refletem as variações obtidas com PCR em tempo real mediante o gene *FANCC* mutado.

### **5.5 - Via Fanconi e STATIP1**

Os resultados da PCR sugerem que os níveis de mRNA de STATIP1 bastante reduzidos nas células HSC536, ou seja, que possuem o gene *FANCC* mutado. Com isso, pode ser que exista alguma relação entre os genes, *STATIP1* e *FANCC*, que explicar os fenótipos encontrados nas células e pacientes Fanconi, que serão discutidos a seguir.

A proteína STATIP1, faz parte da via de transdução de sinal e ativadora transcricional Jak/STAT. STATIP1 modula a ativação de STAT3, ligando-se a esta em sua forma não fosforilada (Collum, *et al.* 2000). STAT3 tem sido descrito como oncogene, pois estimula a proliferação celular e inibe a apoptose, através da modulação da expressão dos genes *Bcl-2* e *CiclinaD1* (Leeman, *et al.* 2006). Do mesmo modo, as células Fanconi apresentam esses mesmos fenótipos, alta taxa de proliferação em cultura e inibição da apoptose mesmo diante da ineficiência de reparo de lesões na molécula de DNA (Taniguchi e D'Andrea, 2006).

Além das semelhanças celulares, em relação ao desenvolvimento de certos tipos de cânceres, vários trabalhos na literatura mostram que os tipos de

neoplasias mais freqüentes em pacientes Fanconi são HNSCC e LMA (Auerbach, *et al.* 1991; Alter, *et al.* 2003; Kutler, *et al.* 2003). Entretanto, esses mesmos tipos de neoplasia possuem envolvimento de proteínas da via Jak/STAT, como por exemplo, STAT3, que é modulada por STATIP1. Tanto em HNSCC quanto em leucemias, STAT3 apresenta-se constantemente sob sua forma fosforilada (Collum, *et al.* 2000; Benekli, *et al.* 2005; Leemam, *et al.* 2006).

Diante dos fatos discutidos nessa seção e dos resultados obtidos nesse trabalho, provavelmente a diminuição dos níveis de mRNA de STATIP1, em células Fanconi, resulte também na diminuição dessa proteína, e em conseqüência disso talvez a forma ativa da proteína STAT3 aumente. Com isso, possivelmente STAT3 fosforilada promova a proliferação celular e inibição da apoptose, assim resultando nos fenótipos celulares descritos anteriormente e no desenvolvimento de certos tipos de neoplasias.

Vale ressaltar que o papel exato da via Fanconi e sua provável interação com a via Jak/STAT nas respostas celulares as lesões de DNA, no controle do ciclo celular e na morte celular programada é pouco conhecido. Diante disso, é necessário o esclarecimento das relações funcionais entre essas vias para melhor compreensão das manifestações clínicas observadas tanto nos pacientes como dos mecanismos de estabilidade do genoma.

## **6 - Conclusão**

- Com a metodologia do *Differential Display* foi possível analisar alterações na expressão gênica das linhagens adotadas nesse trabalho. Mostrando que há variação na expressão gênica resultante de mutação no gene *FANCC*.
- Diante das análises por PCR em tempo real, o tratamento com MMC não alterou significativamente a expressão dos genes identificados nesse estudo, sendo que as maiores diferenças relacionavam-se aos níveis basais celulares.
- Dentre os genes encontrados, *COXVb*, *FCRLM1* e *FBXO18* estão mais expressos em células Fanconi do grupo de complementação C enquanto que *STATIP1* está inibido, possivelmente, em detrimento da mutação no gene *FANCC*.

## **7 - Perspectivas**

Avaliar a importância de *STATIP1* nos processos relacionados a anemia de Fanconi, tais como progressão do ciclo celular, apoptose, entre outros. Ao mesmo tempo também será avaliado as alterações da proteína STAT3, que é especificamente regulada por STATIP1. Para isso, serão realizados ensaios de *immunoblot* utilizando anticorpos específicos para essas duas proteínas mencionadas e para STAT3 ativada – fosforilação da tirosina 705. Esta avaliação também será realizada mediante a tratamento com agentes genotóxicos e clastogênicos, como MMC e radiação ionizante respectivamente. Com isso esperamos desvendar uma nova interação entre as vias Fanconi/BRCA e Jak/STAT e tentar compreender as características fenotípicas relacionadas a anemia de Fanconi.

## **Bibliografia**

- Ahn B, Kang D, Kim H e Wei Q. Repair of mitomycin C cross-linked DNA in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay. **Mol Cells** 2004; 18: 249-55.
- Alter BP. Cancer in Fanconi anemia, 1997-2001. **Cancer** 2003; 97: 425-440.
- Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. **Genes Dev.** 2004;18:1958-1963.
- Auerbach AD e Allen RG. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. **Cancer Genet Cytogenet** 1991; 51: 1-12.
- Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. **Exp Hematol** 1993; 21: 731-733.
- Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. **Nat Rev.** 2004; 5: 792-804.
- Benekli M, Baer MR, Baumann H e Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. **Blood** 2003; 101: 2940-2954.
- Bridge WL, Vandenberg CJ, Franklin RJ e Hiom K. The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair. **Nat Genet** 2005;37:953-957.
- Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, *et al.* BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. **Cell** 2001; 105:149-160.
- Carreau M. Not-so-novel phenotypes in the Fanconi anemia group D2 mouse model. **Blood** 2004;103:2430-36.
- Cervenka J, Arthur D e Yasis C. Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic aplastic anemia and Fanconi anemia. **Pediatrics** 1981; 67:119-27.

- Chandra S, Levran O, Jurickova I, *et al.* A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. **Mol Therapy** 2005; doi:10.1016/j.ymthe.2005.04.021.
- Chernausk SD. Mendelian genetic causes of short child born small for gestational age. **J Endocrinol Invest** 2006; 29:16-20.
- Chomczynski P e Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem** 1987; 162 (1): 156-9.
- Chung MC e Kawamoto S. IRF-2 is involved in up-regulation of nonmuscle heavy chain II – A gene expression during phorbol ester-induced promyelocytic HL-60 differentiation. **J Biol Chem** 2004; 279: 56042-56052.
- Collum RG, Brustsaert S, Lee G e Schindker C. A Stat3-interacting protein (StIP1) regulate cytokine signal transduction. **PNAS** 2000; 97: 10120-10125.
- complex assembly and activity. **EMBO J** 2002; 21: 3414-3423.
- Cumming RC, Lightfoot J, Beard K, Youssoufian H, O'Brien PJ, Buchwald M. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. **Nat Med** 2001;7:814-820.
- D'Apolito M, Guarnieri V, Boncristiano M, *et al.* Cloning of the murine non-muscle myosin heavy chain IIA gene ortholog of human MYH9 responsible for May-Hegglin, Sebastian, Fechtner, and Epstein syndromes. **Gene** 2002; 286: 215-222.
- Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ e *et al.* Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. **Mol Cell** 2001; 7: 273-282.
- Davis RS, Li H, Chen CC, *et al.* The concentration of FREB/FCRL in patients with rheumatoid arthritis is three times higher than in healthy adults. **GeneRif** 2006 (n°. acesso NM\_032738, www.ncbi.nlm.nih.gov)
- de Winter JP, Rooimans MA, van Der Weel L, *et al.* The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. **Nat Genet** 2000; 24: 15-16.
- de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, *et al.* The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. **Nat Genet.** 1998;20:281-283.

- Facchetti F, Cella M, Festa S, Fremont DH e Colonna M. An unusual Fc receptor-related protein expressed in human centroblasts. **PNAS** 2002; 99:3776-81
- Fagerlie SR, Diaz J, Christianson TA, *et al.* Functional correction of FA-C cells with *FANCC* suppresses the expression of interferon  $\gamma$ -inducible genes. **Blood** 2001; 97: 3017-3024.
- Fagerlie SR, Koretsky T, Torok-Storb B e Agby CG. Impaired Type I IFN-Induced Jak/STAT Signaling in FA-C Cells and Abnormal CD4+ Th Cell Subsets in *Fancc*<sup>-/-</sup> Mice. **J Immun** 2004, 173: 3863–3870.
- Federman N e Sakamoto KM. Topics in pediatric leukemia--Fanconi's anemia: new insights. **MedGenMed** 2005; 7:23.
- Fei P, Yin J e Wang W. New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. **Cell Cycle** 2005; 4:80-86.
- Ferrer M, Rodriguez JA, Spierings EA, de Winter JP, Giaccone G, Kruyt FA. Identification of multiple nuclear export sequences in Fanconi anemia group A protein that contribute to CRM1-dependent nuclear export. **Hum Mol Genet** 2005;14:1271-1281.
- Freie BW, Ciccione SLM, Li X, *et al.* A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induce G2 checkpoint. **J Biol Chem** 2004; 49: 50986-50993.
- Freie BW, Li X, Ciccone SL, *et al.* Fanconi Anemia type C and p53 cooperate in apoptosis and tumorigenesis. **Blood** 2003;10:10-15.
- Fukuhara A, Matshuda M, Nishizawa M, *et al.* Visfatin: A protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science** 2005; 307: 426-430
- Futaki M, Igarashi T, Hauet T, *et al.* The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1 : possible role in protect against oxidative DNA damage. **Carcinogenesis** 2002; 23:67-72.
- Gallmeier E, Calhoun ES, Rago C, *et al.* Targeted Disruption of *FANCC* and *FANCG* in Human Cancer Provides a Preclinical Model for Specific Therapeutic Options. **Gastroenterology** 2006;130:2145–2154



- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, *et al.* Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. **Mol Cell.** 2001; 7:249-262.
- Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **J Mol Biol** 1983;166 (4) :557-80.
- Hanenberg H, Batish SD, Pollok KE, *et al.* Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. **Exp Hematol** 2002; 30: 410-420.
- Hawkes NA, Otero G, Winker GS, *et al.* Purification and characterization of the human elongator complex. **J Biol Chem** 2002; 277: 3047-3052.
- Hirsch B, Shimamura A, Moreau L, *et al.* Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood. **Blood.** 2004;103:2554-2559.
- Hoatlin ME, Zhi Y e Ball H. A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. **Blood** 1999; 94: 3737-3747.
- Holzel M, van diest PJ, Bier P, *et al.* FANCD2 protein is expressed in proliferating cells of human tissues that are cancer-prone in Fanconi anemia. **J Pathol** 2003; 201:198-203.
- Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, *et al.* Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. **Oncogene.** 2004; 23:3122-31271.
- Houghtaling S, Granville L, Akkari Y, *et al.* Heterozygosity for p53 (*Trp53<sup>+/-</sup>*) accelerates epithelial tumor formation in Fanconi anemia complementation group D2 (*Fancd2*) knockout mice. **Cancer Res.** 2005; 65: 85-91.
- Houghtaling S, Timmers C, Noll M, *et al.* Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (*Fancd2*) knockout mice. **Genes Dev** 2003;17:2021-2035.
- Howlett NG, Taniguchi T, Durkin SG, *et al.* The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation for common fragile site stability. **Hum Mol Genet.** 2005; 14: 693-701.

- Howlett NG, Taniguchi T, Olson S e *et al.* Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. **Science** 2002; 297:606-609.
- Hussain S, Wilson JB, Blom E, *et al.* Tetratricopeptide-motif-mediated interaction of FANCG with recombination proteins XRCC3 and BRCA2. **DNA Repair (Amst)**. 2006 – epub.
- Hussain S, Witt E, Huber PA, *et al.* Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. **Hum Mol Genet** 2003; 12: 2503-2510.
- Inozume T, Matsuzaki Y, Kurihara S, *et al.* Novel melanoma antigen, FCRL/FREB, identified by cDNA profile comparison using DNA chip are immunogenic in multiple melanoma patients. **Int J Cancer** 2005; 114: 283-290.
- Joenje H e Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. **Nat Rev Genet** 2001; 2: 446-457.
- Kang D, LaFrance R, Su Z e Fisher PB. Reciprocal subtraction differential RNA display: An efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. **PNAS** 1998; 95: 13788-13793.
- Kim J, Kim JH, Lee SH, *et al.* The novel human DNA helicase hFBH1 is an F-box protein. **J Biol Chem** 2002; 277: 24530-24537.
- Kontou M, Adelfalk C, Hirsch-Kauffmann M e Schweiger M. Suboptimal action of NF-kappaB in Fanconi anemia cells results from low levels of thioredoxin. **Biol Chem** 2003; 384; 1501-1507.
- Kruyt FA, Hoshino T e Liu JM. Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. **Blood** 1998; 92: 3050-3056.
- Kumaresan KR e Lambert MW. Fanconi anemia, complementation group A, cells are defective in ability to produce incisions at sites of psoralen interstrand cross-links. **Carcinogenesis** 2000; 21: 741-51.
- Kupfer GM, Yamashita T, Naf D, *et al.* The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2. **Blood** 1997; 90:1047-54.

- Kuraoka I, Kobertz WR, Ariza RR, *et al.* Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease. **J Biol Chem** 2000; 275: 26632-36.
- Kutler DI, Singh B, Satagopan J, *et al.* A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**. 2003;101:1249-1256.
- Lee J e Paull T. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. **Science**. 2004; 304: 93-96.
- Leeman RJ, Lui VW, Grandis JR. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. **Expert Opin Biol Ther** 2006; 6(3): 231-41
- Léveillé F, Blom E, Medhurst AL, *et al.* The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein. **J Biol Chem**. 2004;279:39421-39430.
- Léveillé F, Ferrer M, Medhurst AL, *et al.* The nuclear accumulation of the Fanconi anemia protein FANCE depends on FANCC. **DNA Repair** 2006; 5: 556-565.
- Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, *et al.* Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. **Blood**. 2004;103:2498-2503. Epub 2003 Nov 2420.
- Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, *et al.* The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. **Nat Genet**. 2005; 37:934-935.
- Levrán O, Attwooll C, Henry RT, *et al.* The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. **Nat Genet**. 2005;37:931-933.
- Li Y e Youssoufian H. MxA Overexpression Reveals a Common Genetic Link in Four Fanconi Anemia Complementation Groups. **J Clin Invest** 1997; 11: 2873–2880.
- Liang P e Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science** 1992; 257: 967-71.
- Litman R, Peng M, Jin Z, *et al.* BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. **Cancer Cell**. 2005.
- Litosch I. Novel mechanisms for feedback regulation of phospholipase C-beta activity. **IUBMB Life** 2002; 54: 253-60.

- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, *et al.* (2004). *Molecular Biology of the Cell*. W.H. Freeman and Company, New York. 5 ed.
- Lomax MI, Hsieh CL, Darras BT e Francke U. Structure of the human cytochrome c oxidase subunit Vb gene and chromosomal mapping of the coding gene and of seven pseudogenes. **Genomics** 1991; 10: 1-9.
- Magdalena N, Pilonetto DV, Bitencourt MA, Pereira NF, Ribeiro RC, Leng M e Pasquini R. Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the *FANCA* 3788-3790del mutation. **Braz J Med Biol Res.** 2005; 38: 669-73.
- Masuda K, Davis RS, Maruyama T, *et al.* FcRY, an Fc receptor related gene differentially expressed during B lymphocyte development and activation. **Gene** 2005; 363: 32-40.
- Matisushita N, Kitao H, Ishiai M, *et al.* A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. **Mol Cell** 2005; 19: 841-847.
- Matsushita T, Hayashi H, Kunishima S, *et al.* Targeted disruption of mouse ortholog of the human MYH9 responsible for macrothrombocytopenia with different organ involvement: hematological, nephrological, and otological studies of heterozygous KO mice. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 325: 1163-1171.
- McHugh PJ, Spanswick VJ e Hartley JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. **Oncology.** 2001; 2: 483-89.
- McMahon LW, Sangerman J, Goodman SR, *et al.* **Biochemistry** 2001; 40: 7025-34.
- Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, *et al.* A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. **Nat Genet.** 2003;35:165-170.
- Meetei AR, Levitus M, Xue Y, *et al.* X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. **Nat Genet.** 2004;36:1219-1224.
- Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, *et al.* A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. **Nat Genet.** 2005;37:958-963.

- Meroni G e Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. **Bioessays** 2005; 27: 1147-57.
- Mosedale G, Niedzwiedz W, Alpi A, *et al.* The vertebrate Hef ortholog is a component of Fanconi anemia tumor-suppressor pathway. **Nature Struc & Mol Biol.** 2005; 12: 763-770.
- Nahas SA, Lai C e Gatti R. Post-irradiation phosphorylation of structural maintenance chromosome 1 (SMC1) is independent of the Fanconi protein pathway. **Int J Rad Onco Biol Phys** 2005; 61: 1167-1172.
- Nakagashi K, Yang Y, Pierce AJ, *et al.* Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. **Proc Natl Acad Sci.** 2005; 102: 1110-1115.
- Niedernhofer LJ, Odjik H, Budzowska M, *et al.* The structure-specific endonuclease Ercc1-XPF is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. **Mol Cell Biol.** 2004; 24: 5776-87.
- Niedzwiedz W, Mosedale G, Johnson M, *et al.* The Fanconi anemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. **Mol Cell.** 2004; 15: 607-620.
- Nijman SMB, Huang TT, Dirac AMG, *et al.* The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. **Mol Cell.** 2005; 17:331-339.
- O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, *et al.* A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. **Nat Genet.** 2003; 33: 497-501.
- Osborn AJ, Elledge SJ, Zou, L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. **Trends Cell Biol.** 2002; 12:509-516.
- Otsuki T, Furukawa Y e Ikeda K. Fanconi anemia protein, FANCA, associates with BRG1, a component of the human SWI/SNF complex. **Hum Mol Genet** 2001; 10: 2651-2660.
- Pace P, Johnson M, Tan WM, *et al.* FANCE : the link between Fanconi anaemia
- Pang Q, Christianson TA, Keeble W, *et al.* The anti-apoptotic function of Hsp70 in the PKR-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. **J Biol Chem** 2002.

- Pang Q, Fagerlie S e Christianson TA. The Fanconi anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by gamma interferon and hematopoietic growth factors. **Mol Cell Biol** 2000; 20: 4724-4735.
- Park S, Ciccone SLM, Beck BD, *et al.* Oxidative stress/damage induces multimerization and interaction of Fanconi anemia proteins. **J Biol Chem.** 2004; 29: 30053-30059.
- Park W, Margossian S, Horwitz AA, *et al.* Direct DNA binding activity of the Fanconi anemia D2 protein. **J Biol Chem.** 2005; 280: 23593-98.
- Planitzer SA, Machl AW, Rueckles M e Kubbies M. Identification of a novel cDNA overexpressed in Fanconi's anemia fibroblasts partially homologous to a putative L-3-phosphoserine-phosphatase. **Gene** 1998; 210: 297-306.
- Planitzer SA, Machl AW, Schindler D e Kubbies M. Small deletions in the regulatory 3'UTR of the human alpha-trpomyosin gene identified by differential display. **Mol Cell Probes** 1998; 12: 35-40.
- Powelka AM, Seth A, Virbasius JV, *et al.* Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. **J Clin Invest** 2006; 116: 125-136.
- Qiao F, Mi J, Wilson JB, *et al.* Phosphorilation of Fanconi anemia (FA) complementation group G protein, FANCG, at serina 7 is important for function of FA pathway. **J Biol Chem** 2004; 279: 46035-46045.
- Reuter TY, Medhurst AL, Waisfisz Q, *et al.* Yeast two-hybrid screens imply involvement of Fanconi anemia proteins in transcription regulation, cell signaling, oxidative metabolism, and cellular transport. **Exp Cell Res** 2003; 289: 211-221.
- Rosenberg PS, Grene MH e Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. **Blood.** 2003; 101: 822-826.
- Rosselli F, Briot D e Pichierri P. The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-links repair. **Biochimie** 2003; 85: 1175-1184.
- Saadatzadeh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Hong P, *et al.* Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway. **J Biol Chem** 2004;279:16805-16812.

- Saez CG, Myers JC, Shows TB e Leinwand LA. Human nonmuscle myosin heavy chain mRNA: generation of diversity through alternative polyadenilation. **PNAS** 1990; 87: 1164-1168.
- Sambrook J, Fritsch EF e Maniats T. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York 1987, 2ª edição.
- Sanger F, Nicklen S e Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS** 1977; 74(12): 5463-7
- Schar P, Fasi M e Jessberger R. SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. **Nucl Acids Res** 2004; 32: 3921-3929.
- Seyschab H, Sun Y, Friedl R, *et al.* G2 phase cell cycle disturbance as a manifestation of genetic cell damage. **Hum Genet** 1993; 92: 61-8.
- Steger DJ, Haswell ES, Miller AL, *et al.* Regulation of Chromatin Remodeling by Inositol Polyphosphates. **Science** 2003; 299: 114 – 116.
- Stevens RF e Meyer S. Historical Review - Fanconi and Glanzmann: the men and their works. **British J Haemat.** 2002; 119: 901-904.
- Stiff T, Reis C, Alderton GK, *et al.* Nbs1 is required for ATR-dependente phosphorylation events. **EMBO.** 2005; 24: 199-208.
- Strathdee CA, Duncan AM e Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. **Nat Genet** 1992; 3: 196-198.
- Taniguchi T e D'Andrea AD. The molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. **Blood.** 2006. Epub (DOI 10.1182/blood-2005-10-4240).
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, *et al.* Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. **Cell.** 2002;109:459-472.
- Thomashevski A, High AA, Drozd M, *et al.* The Fanconi anemia core complex forms four complexes of different sizes in different subcellular compartments. **J Biol Chem.** 2004; 25: 26201-26209.
- Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, *et al.* Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell.* 2001;7:241-248.
- Tischkowitz M e Dokal I. Fanconi anaemia and leukaemia – clinical and molecular aspects. **British J Haemat.** 2004; 126: 176–91

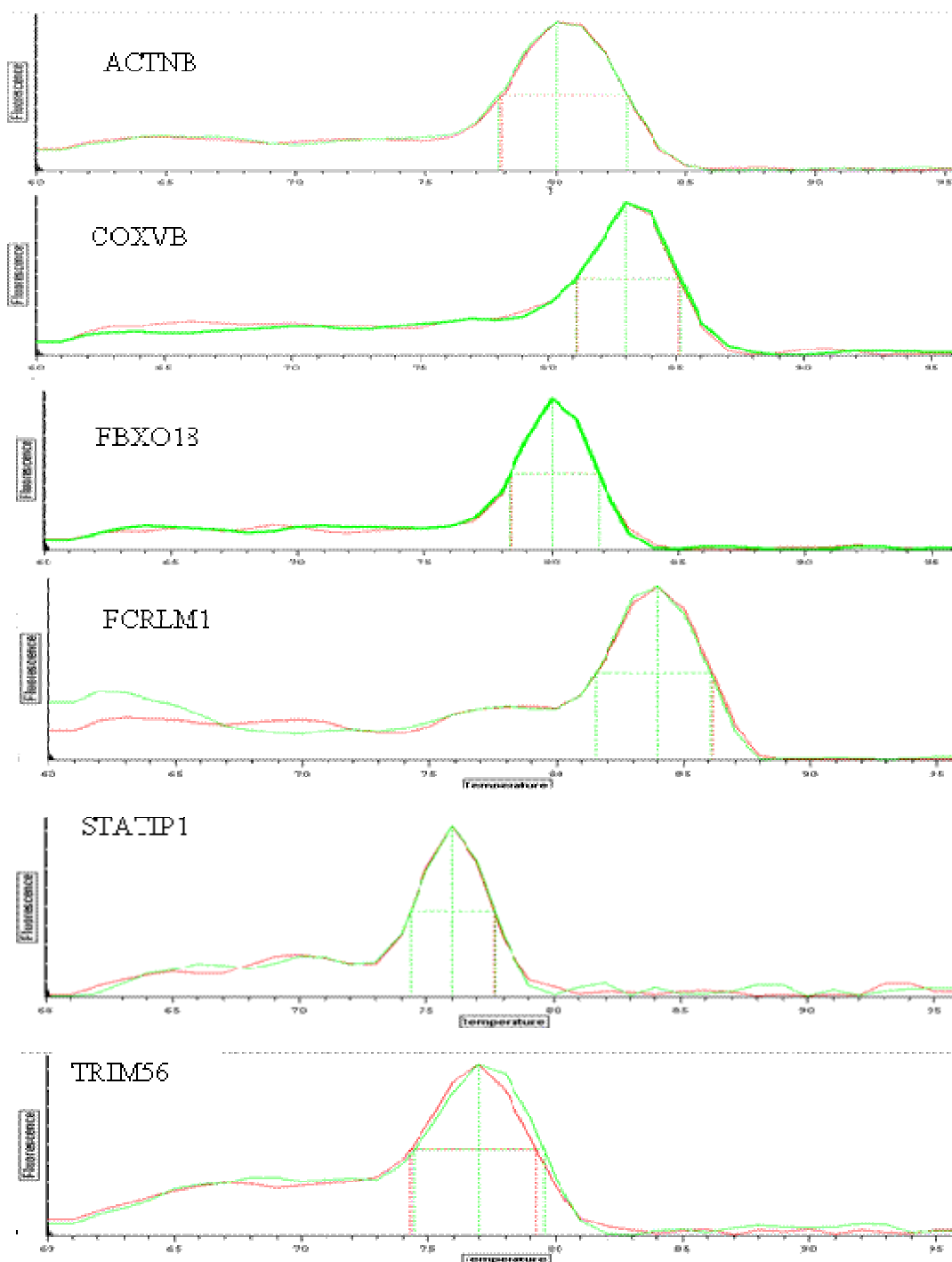
- Titus TA, Selvig DR, Qin B, *et al.* The Fanconi anemia gene network is conserved from zebrafish to human. **Gene** 2006; 371: 211-223.
- Tonnies H, Huber S, Kuhl JS, *et al.* Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. **Blood** 2003;101:3872-4.
- Townsend PA, Cragg MS, Davidson SM, *et al.* STAT1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. **J Cell Sci** 2005 ;118: 1629-1639.
- Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. **Nat Rev Cancer**. 2004;4:814-819.
- van Zeeburg HJT, Snijders PJF, Pals G, *et al.* Generation and molecular characterization of head and neck squamous cell lines of Fanconi anemia patients. **Cancer Res**. 2005; 65: 1271-1276.
- Wilkinson KD, Ventii KH, Friedrich KL, Mullally JE. The ubiquitin signal: assembly, recognition and termination. **EMBO reports**. 2005; 6:815-820.
- Wong JC, Alon N, McKerlie C, *et al.* Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. **Hum Mol Genet** 2003;12:2063-2076.
- Wood RD, Mitchell M e Lindahl T. Human DNA repair genes, 2005. **Mutation Research**. 2005; 577: 275-283.
- Yamashita T, Barber DL, Zhu Y, Wu N, D'Andrea AD. The Fanconi anemia polypeptide FACC is localized to the cytoplasm. **PNAS** 1994; 91: 6712-6716.
- Zanier R, Briot D, Dugas du Villard JA, Sarasin A e Rosselli F. Fanconi anemia C gene product regulates expression of genes involved in differentiation and inflammation. **Oncogene** 2004; 23: 5004-5013.
- Zhang Y, Cho Y, Peterson BL, *et al.* Ataxia telangiectasia mutade proteins , MAPKs, and RSKs are involved in the phosphorylation of STAT3. **J Biol Chem** 2003; 278: 12650-12659.



Zhu W and Dutta A. An ATR- and BRCA1-Mediated Fanconi Anemia Pathway Is Required for Activating the G2/M Checkpoint and DNA Damage Repair upon Rereplication. **Mol Cell Biol** 2006; doi:10.1128/MCB.02141-05, 4601–4611.

## Anexo

Imagem gerada pelo programa Opitcon Monitor 2.03 (MJ Research, Inc.), onde consta o resultado da curva de dissociação dos amplicons (curva de *Melting*) dos genes beta Actina (*ACTNB*), *COXVB*, *FBXO18*, *FCRLM1*, *STATIP1* E *TRIM56*. Os picos únicos correspondentes a cada gene, mostra a especificidade dos iniciadores iniciadores.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)